

Vitamin K-Bestimmung im biologischen Verfahren

Ernst Michael Bomhard

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554607_0060

Aus dem Institut für Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Komm. Vorst.: Prof. DDr. Dr. h.c. mult. J. Brüggemann)

Gefertigt unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. J. Gropp

Vitamin K - Bestimmung im biologischen Verfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ernst Michael Bomhard
aus Hohenstadt

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Gropp

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 26.7.1974



Meinen Eltern

A.	Einleitung	1
B.	Literaturübersicht	3
1.	Blutgerinnung	3
1.1.	Besonderheiten beim Huhn	7
2.	Vitamin K	8
2.1.	Nomenklatur	8
2.2.	Historischer Rückblick	10
2.3.	Vorkommen	11
2.4.	Physiologie	11
2.4.1.	Wirkform im Organismus	11
2.4.2.	Wirkungsort	14
2.4.3.	Biologische Bedeutung	15
2.4.4.	Wirkungsmechanismus	17
2.4.5.	Bedarfsdeckung	23
3.	Vitamin K - Antagonisten	24
4.	Methoden der Vitamin K - Bestimmung im biologischen Testverfahren	28
4.1.	Grundlagen	28
4.2.	Thrombokinasen (=Thromboplastin)	30
4.3.	Vorhandene Modelle zur Vitamin K - Be- stimmung im biologischen Testverfahren	31
4.4.	Standardpräparate	34
C.	Eigene Untersuchungen	37
1.	Methodik	40
1.1.	Tiermaterial	42
1.2.	Depletion	42
1.3.	Haltung der Versuchstiere	42
1.4.	Herstellung der Rationen	43
1.5.	Vitamin K - Quelle	43
1.6.	Material und Methodik der Thrombo- plastinzeit-Bestimmung	43

	S.
1.6.1. Geräte	43
1.6.2. Glaswarenreinigung	44
1.6.3. Blutentnahme	44
1.6.4. Thrombokinaseherstellung	45
1.6.5. Thromboplastinzeit-Bestimmung nach Quick	45
2. Versuch I	46
2.1. Versuchsanlage	46
2.2. Versuchsdurchführung	48
2.3. Ergebnisse	48
2.3.1. Mortalität	48
2.3.2. Gewichtsentwicklung	50
2.3.3. Futterverzehr und Futterverwertung	53
2.3.4. Thromboplastinzeit	54
3. Versuch II	60
3.1. Versuchsanlage	60
3.2. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	62
3.3. Ergebnisse	63
3.3.1. Vorperiode	63
3.3.2. Versuchsperiode	64
3.3.2.1. Mortalität	64
3.3.2.2. Gewichtsentwicklung	64
3.3.2.3. Futterverzehr und Futterverwertung	67
3.3.2.4. Thromboplastinzeit	68
3.3.2.4.1. Thromboplastinzeit in Abhängigkeit zur Menadiondosierung	68
3.3.2.4.2. Thromboplastinzeit und Mortalität	73
3.3.2.4.3. Thromboplastinzeit und Gewichts- entwicklung	73
3.3.2.4.4. Thromboplastinzeit und Futterverwertung	74
4. Versuch III	75
4.1. Versuchsplan	76
4.2. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	79
4.3. Ergebnisse	79

S.

4.3.1.	Mortalität	80
4.3.2.	Gewichtsentwicklung	81
4.3.3.	Futtermittelverzehr und Futtermittelverwertung	82
4.3.4.	Thromboplastinzeit	83
4.3.4.1.	Vergleich der Thromboplastinzeit mit den übrigen Versuchskriterien	87
4.3.5.	Vergleichende Wertbemessung von MSB und MPB als Vitamin K - Quellen	88
4.3.5.1.	Chemische Analysen-Daten	88
4.3.5.2.	Biologische Bewertung anhand tier- experimenteller Daten	91
D.	Diskussion	95
1.	Mortalitätsrate	95
2.	Gewichtsentwicklung	98
3.	Futtermittelverzehr und Futtermittelverwertung	99
4.	Thromboplastinzeit	99
5.	Vitamin K - Aktivität und Stabilitäts- verhalten von MSB u. MPB	101
6.	MSB und MPB als Standardpräparate	106
7.	Abschließende Betrachtung	106
E.	Zusammenfassung	108
E.1.	Summary	111
F.	Literaturverzeichnis	114
	Lebenslauf	139

A. EINLEITUNG

In den letzten Jahren hat die Ergänzung von Geflügelrationen mit Vitamin K zunehmende Bedeutung erlangt. Dies gilt sowohl für Allein- wie auch Ergänzungsfuttertypen. Der Trend der Futtermittelindustrie, Mischfutter mit höherer Energiedichte herzustellen, führte zu einer Reduzierung des Anteils an Vitamin K - haltigem Grünmehl in der Mischung. Dazu kommt, daß die heute vorwiegend eingesetzten Extraktionsschrote aufgrund ihres geringen Fettgehalts wesentlich weniger Vitamin K enthalten, als die früher bevorzugten Ölkuchen. Weiter darf angeführt werden, daß heute Küken-, Geflügelmast- und Junghennenfutter kaum ohne Zusatz eines Coccidiostatikums hergestellt werden. Diese Verbindungen (z.B. Sulfaquinoxalin) sind z.T. als Vitamin K - Antagonisten bekannt, oder sie hemmen die Vitamin K - Produktion der Darmbakterien durch ihre bakterio statische Wirkung.

Aber auch bei unverminderter Vitamin K - Produktion der Darmbakterien wird die Nutzung dieser Vitaminquelle infolge moderner Haltungsmethoden zunehmend eingeschränkt. Legehennen werden heute in größeren Betriebseinheiten, beispielsweise vorwiegend in Batterie- bzw. Käfigsystemen, gehalten, welche eine Koprophagie weitgehend ausschließen.

Eine deutliche Abnahme der originären Vitamin K - Aktivität einer Futtermischung erfolgt während des Pelletiertvorgangs (Hitze einwirkung).

Die Praxis der Mischfutterherstellung hat aus den genannten Verhältnissen ihre Schlußfolgerungen bereits gezogen: Allen ausgewogenen Geflügelrationen wird heute Vitamin K - meist in Form von Menadionderivaten - routinemäßig zugesetzt.

Eine der wichtigsten Anforderungen, welche generell an einen Mischfutterzusatz (wie auch an jedes Pharmakon) zu stellen ist, betrifft seine Stabilität. Die in der Praxis eingesetzten Vitamin K - Präparationen Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB), Menadion-Natrium-Bisulfit-Komplex (MSBC) und Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit (MPB) erfüllen - zumindest in Reinform - dieses Kriterium weitestgehend. Relativ wenige und zudem widersprüchliche Aussagen liegen aber über das Stabilitätsverhalten der genannten Präparationen im Mischfutter vor, dessen Konzentration an zugesetztem Vitamin K in der Regel zwischen 0,5 - 2 ppm (Alleinfutter) bzw. 5 - 20 ppm (Ergänzungsfutter) beträgt.

Erst in jüngster Zeit (68) ist es gelungen, die Nachweisgrenze der chemischen Vitamin K - Analytik auf ca. 1 ppm Menadion zu senken. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß - gerade im Bereich der Nachweisgrenze und damit in einer für Alleinfuttertypen interessanten Vitamin K - Konzentration - die chemisch-analytischen Ergebnisse nur ungenügenden Aufschluß über die tatsächlich vorhandene und auch biologisch wirksame Vitamin K - Aktivität geben. Zur Ermittlung des effektiven Vitamin K - Gehalts sowie dessen Stabilität gegenüber Lagerungs- und Futterbehandlungs- (Pelletier-) einflüssen bieten sich biologische Nachweisverfahren an.

Aus diesen Gründen wurde mir an den Instituten für Tierphysiologie und Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Universität München die Aufgabe gestellt, ein praktikables und damit hinreichend genaues biologisches Verfahren zur Bestimmung der Vitamin K - Aktivität im Mischfutter zu entwickeln.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Blutgerinnung

Vitamin K wurde 1930 als antihämorrhagischer Faktor entdeckt (34). Seine Bedeutung als Vitamin dürfte auch heute noch in der Beeinflussung der Blutgerinnung, die im Vitamin K - Mangel verzögert abläuft, zu sehen sein.

Die biologischen Nachweisverfahren von Vitamin K sind folgerichtig auf dieser Wirkung, die sich als Verzögerung oder Beschleunigung der Blutgerinnungszeit im allgemeinen messen läßt, aufgebaut.

Deshalb ist den folgenden Kapiteln über Vitamin K und seine Antagonisten sowie deren Wirkungsmechanismen ein kurzer Abriß der heute gültigen Vorstellungen zur Blutgerinnung vorangestellt.

Nach neuesten Untersuchungen und in Anlehnung an den Vorschlag von BIGGS und MAC FARLANE (1962) wird der Gerinnungsprozeß als eine Serie von Proteinreaktionen aufgefaßt, in denen jeder Gerinnungsfaktor als Substrat für die Aktion des vorangegangenen Reaktionsprozesses dient und gleichzeitig Enzym für die Umwandlung der nächsten Stufe wird (82). Ziel dieses Reaktionsablaufes ist die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, die durch das eigentliche Gerinnungsferment Thrombin bewerkstelligt wird. Diese Reaktion erfolgt sehr schnell, deshalb liegt Thrombin im strömenden Blut nur in Form des Proferments Prothrombin (Faktor II) vor. Das Prothrombin wird durch zwei verschiedene Systeme aktiviert:

- 1.) Gewebsthrombokinasen = Extrinsic System
- 2.) Blutthrombokinasen = Intrinsic System

Die Gewebsthrombokinese entsteht bei der Freisetzung intrazellulären Gewebssaftes, der mit den Gerinnungsfaktoren V, VII und X sowie Ca-Ionen das aktive Gewebsthromboplastin bildet. Dieses Aktivatorsystem führt zu einer raschen Blutgerinnung (in Sekunden). Das Intrinsic System bildet Thrombokinese ohne Gegenwart von Gewebssaft. Auslösend wirkt die Freisetzung des Thrombozyten-Faktors 3 als Folge des Zusammenhaftens von Blutplättchen mit Änderung ihrer Oberflächeneigenschaften. Daran schließt sich ein kompliziertes Zusammenwirken der Faktoren XII, XI, X, IX, VIII, V und der Ca-Ionen, welches schließlich die aktive Blutthrombokinese hervorbringt, an. Diese Reaktion benötigt einige Minuten.

Mit der Bildung von Fibrin ist die Gerinnung weitgehend abgeschlossen. Es folgt die Retraktion des Blutkuchens. Danach setzt dann die Fibrinolyse ein, ein Prozeß, der das gebildete Fibringerinnsel wieder auflösen kann und der im biochemischen Aufbau dem Gerinnungssystem ähnelt.

Obleich die Blutgerinnung wie eine Kettenreaktion abläuft, und die verschiedenartige Wirkung der einzelnen Faktoren einer geteilten Betrachtungsweise der Gerinnungskinetik widerspricht, hat man aus didaktischen und gerinnungsanalytischen Gründen diesen Vorgang in Phasen unterteilt (49).

Die erste Phase schließt mit der Bildung der Thrombokinese ab. Sie ist abhängig von Menge und Aktivität der Thrombozyten und der Faktoren VIII, IX, X, XI und XII. Als zweite Phase wird die enzymatische Umwandlung des Prothrombins in Thrombin unter Beteiligung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren Thrombokinese, Ca-Ionen, Faktor V, VII und X bezeichnet. Die Überführung des Plasmafibrinogens in Fibrin unter unmittelbarem Einfluß

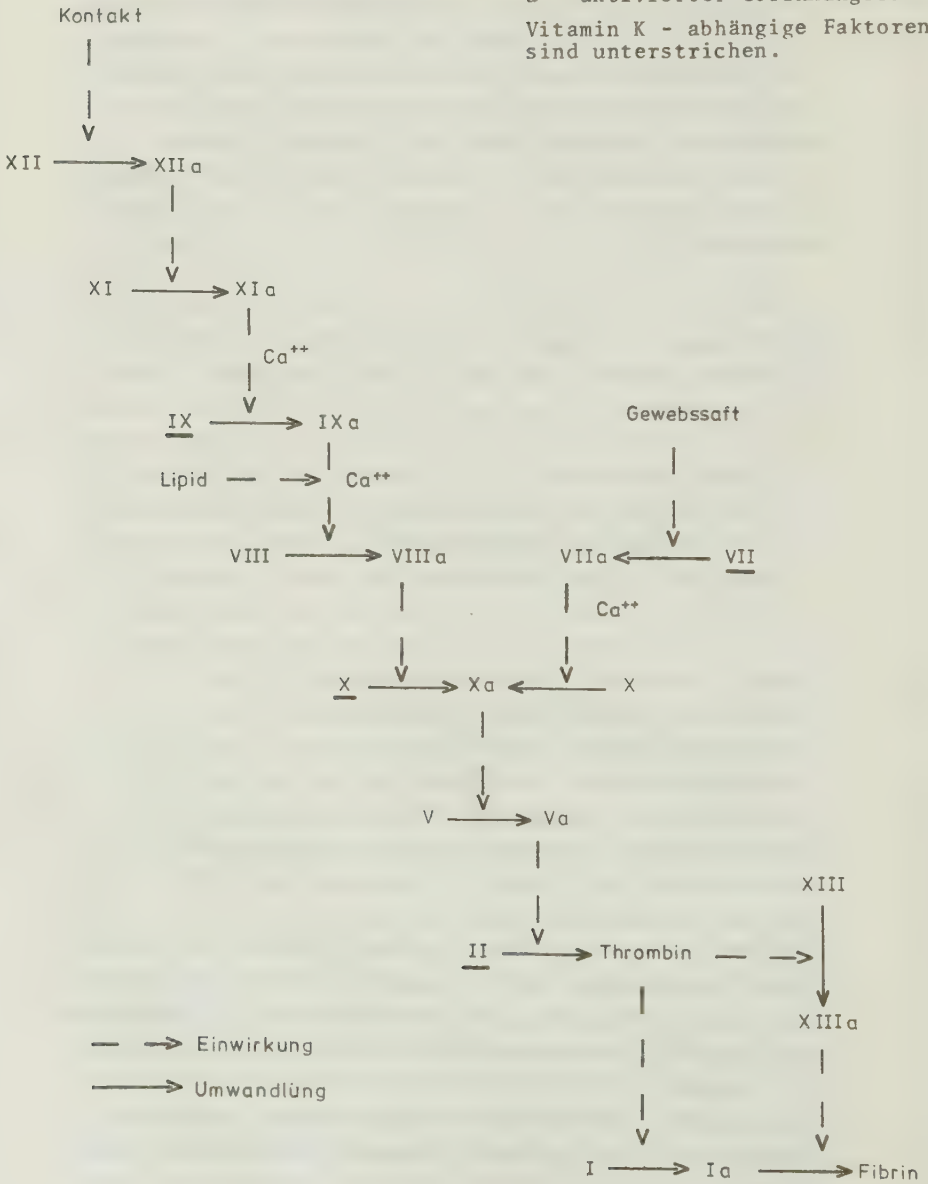
des Thrombins gilt als 3. Phase. Die Retraktion des Fibringerinnsels beginnt nach HARTERT et al. (1957) unmittelbar nach der Ausbildung der ersten Fibrinfäden und endet normalerweise beim Menschen ca. drei Stunden nach der Blutgerinnung. In dieser Zeit sondert das Koagulum des Menschen mehr als ein Drittel seines Volumens als Serum ab. Dieser Vorgang wird als Nachphase und zum Teil auch als 4. Phase der Blutgerinnung angesprochen.

BRINKHOUS (1940) stellte die These auf, daß die Blutungen bei Vitamin K - Mangel ein Zeichen von Prothrombinmangel seien. Das erwies sich später als unvollständig. Drei weitere Plasmaproteine sind ebenfalls Vitamin K - abhängig: Faktor VII = Prokonvertin, Faktor IX = Christmas Faktor und Faktor X = Stuart Prower Faktor (50,103,117,136). Ihr Einfluß auf den Gerinnungsmechanismus ist ebenso wichtig wie der von Prothrombin. Den Ort ihrer Wirkung im Gesamtablauf der Blutgerinnung verdeutlicht Abb. 1.

Die Gerinnungsproteine unterliegen einem ständigen, relativ schnellen Abbau, hauptsächlich in den peripheren Gefäßen. Die biologischen Halbwertszeiten liegen nach JAENECKE (1971) für Faktor II bei 60 Stunden, für die Faktoren X, IX und VII bei 40, 20 bzw. 6 Stunden. Deshalb führen Störungen der kontinuierlichen Neubildung dieser Faktoren, z.B. im Vitamin K - Mangel oder nach Verabreichung von Vitamin K - Antagonisten schon innerhalb kurzer Zeit zum Absinken ihres Gehalts im Blut und damit zu verlängerten Gerinnungszeiten. Entsprechend ihren biologischen Halbwertszeiten nehmen diese Faktoren dann in der Reihenfolge VII-IX-X-II ab (82,92). VINAZZER (1972) gibt diese Reihenfolge allerdings mit VII-X-IX-II an, nach DEUTSCH (1966) lautet sie VII-X-II-IX. Nach dem Absetzen der synthesehemmenden Noxe kehrt Faktor VII zuerst zurück, die anderen folgen ohne konstante Reihenfolge (92).

Abb. 1 - Gerinnungskaskade

a = aktivierter Gerinnungsfaktor
Vitamin K - abhängige Faktoren
sind unterstrichen.



Klinisch manifestiert sich eine hämorrhagische Diathese erst beim Absinken dieser Faktoren unter 10 % der Norm.

1.1. Besonderheiten beim Huhn

DIDISHEIM et al. (1959) konnten beim Huhn eine Blutthrombokinasbildung nicht feststellen. Auch fanden sie bei ihren Untersuchungen keinen der Faktoren IX, XI und XII. WARTELE (1958) konnte dagegen am Substratplasma des Huhns eine, wenn auch im Vergleich zum Menschen wesentlich geringere Blutthrombokinasbildung nachweisen. Auch nach diesen Untersuchungen fehlen die o.g. Faktoren IX, XI und XII nahezu vollständig im Plasma des Huhnes. DORN (1965) weist eine sehr geringe Faktor-IX-Aktivität bei der sehr langsamen Blutthrombokinasbildung des Huhns nach. Er hält die verminderte Aktivität im Intrinsic System des Huhns nicht für eine funktionelle Mangelleistung. Sie diene vielmehr der Kompensation des hochaktiven Extrinsic Systems und sei somit ein regulierender Ausgleich der in- und übereinandergreifenden kinetischen Funktionen im Blutgerinnungssystem.

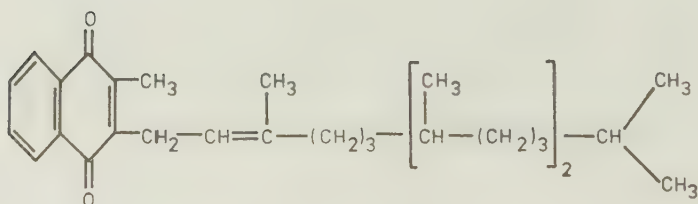
2. Vitamin K

2.1. Nomenklatur

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift verwendeten Bezeichnungen und Abkürzungen für die verschiedenen Vitamin K - wirksamen Verbindungen erfolgen in Anlehnung an einen Vorschlag der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (81).

Demnach wird das 2-Methylnaphthochinon mit einer Phtylseitenkette wie bisher Phyllochinon genannt, die bisherige Abkürzung K_1 durch K ersetzt (Abb. 2).

Abb. 2 - Phyllochinon = 2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon



Die 2-Methylnaphthochinone mit einer Multiprenylseitenkette werden als Menachinone bezeichnet und mit MK (bisher K_2) abgekürzt (Abb. 3). Eine arabische Zahl hinter einem Bindestrich gibt die Anzahl der isoprenoiden Einheiten an, z.B. Menachinon - 7; Abkürzung MK - 7 (bisher meist $K_{2(35)}$).

Abb. 3 - Menachinon-7 = 2-Methyl-3-(all-trans-farnesyl-geranyl-geranyl)-1,4-napththochinon

2.2. Historischer Rückblick

In Experimenten an Küken, die an intramuskulären und subkutanen Blutungen litten, konnte DAM (1930) die Existenz eines antihämorrhagischen Faktors nachweisen, den er später (1935) im nicht-verseifbaren, sterolhaltigen Extrakt aus Schweineleberfett fand und als Koagulationsvitamin bzw. Vitamin K bezeichnete. Zum gleichen Zeitpunkt (1939) isolierten DAM in Zusammenarbeit mit KARRER (37) und unabhängig davon DOISY (108,123) Vitamin K (Phyllochinon) aus Luzerne, DOISY noch Menachinon-7 aus faulendem Fischmehl (123). DOISY's Gruppe klärte im selben Jahr auch die chemische Struktur von Phyllochinon auf. Von derselben Arbeitsgruppe konnte durch Synthese von Phyllochinon die Richtigkeit der von ihr erarbeiteten Phyllochinon-Struktur-Formel unter Beweis gestellt werden. Die Synthese gelang etwa gleichzeitig unabhängig davon auch KARRER et al. (1939), ALMQUIST und KLOSE (1939) und FIESER (1939 a, 1939 b). Ein Jahr später veröffentlichte DOISY's Gruppe schließlich die Aufklärung der Struktur von Menachinon-7 (23).

Bis heute hat man ca. 20 in der Natur vorkommende Naphthochinonabkömmlinge mit ungesättigten Seitenketten von ein bis dreizehn Isopreneinheiten isoliert.

Die von ANSBACHER (1939) festgestellte gute Vitamin K - Wirkung des fettlöslichen unsubstituierten 2-Methyl-1,4-Naphthochinons, genannt Menadion, führte zu der Entwicklung von synthetischen, wasserlöslichen Präparaten, die auf Menadion als Grundkörper aufgebaut sind, wie z.B. Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB), Menadion-Natrium-Bisulfit-Komplex (MSBC) und Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit (MPB). Diese Präparate werden heute zur Deckung des Vitamin K - Bedarfs in Mischfutter eingebracht.

2.3. Vorkommen

Die K - Vitamine sind in der Natur weit verbreitet. Phyllochinon wird in grünen Pflanzen und in vielen Algen gebildet (99). Bei den photosynthetisierenden höheren Pflanzen gelten die Chloroplasten als die Zellorganellen der Phyllochinon-Synthese (101). Leuko- und Chromoplasten werden als Bildungsorte in den nicht photosynthetisierenden Pflanzen angesehen (100).

Die Menachinone sind bakteriellen Ursprungs. Bisher wurden als Menachinon-synthetisierende Bakterien sowohl gram-positive wie auch gram-negative Aerobier und Anaerobier gefunden. Das Spektrum der von ihnen gebildeten Isoprenologe reicht von Menachinon-1 bis Menachinon-13. Die wichtigsten Produzenten sind *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus albus* und *aureus*, *Bacillus subtilis* und *Megaterium* sowie *Sarcina flava* und *lutea*. Die Einzelschritte der Vitamin K - Synthese in Pflanzen und Bakterien sind noch nicht genau bekannt.

2.4. Physiologie

2.4.1. Wirkform im Organismus

Bei der Vielzahl der antihämorrhagisch wirksamen Substanzen stellt sich die Frage, in welcher Form Vitamin K im tierischen Organismus wirkt. Bei Versuchen mit Ratten, Meerschweinchen, Hühnern, Tauben, Schnecken, Regenwürmern und Insekten, denen MARTIUS zweifach radioaktiv markiertes Menadion, Phyllochinon bzw. Menachinon oral oder parenteral zuführte, beobachtete er in allen Fällen eine teilweise Umwandlung in Menachinon-4 (22,112,116). Diese Verbindung fand der Autor in allen untersuchten Organen, bei den Wirbeltieren konzentriert in den Sarkosomen des Herzmuskels,

in der Niere und in der Skelettmuskulatur. Die Leber enthielt bei Applikation von Phyllochinon nahezu kein Menachinon-4, sondern fast ausnahmslos diese Verbindung. MARTIUS bewies außerdem, daß die Darmbakterien, neben ihrer Fähigkeit, Menachinone zu synthetisieren, auch in der Lage sind, die Seitenkette von Phyllochinon bzw. Menachinonen abzuspalten. Nach Absorption des Methylnaphthochinonrestes wird dann Menachinon-4 durch intrazelluläre Synthese gebildet. Die Synthese-Leistung der Mikroflora ist aber quantitativ begrenzt.

Aus der Tatsache, daß in den o.a. Versuchen fast nur Phyllochinon in der Leber zu finden war, schloß MARTIUS, daß es möglicherweise in diesem Organ auch funktionell das Menachinon-4 ersetzt.

DIALAMEH et al. (1971) wiesen Menachinon-4 in den Lebern von Küken und Ratten nach, denen sie vorher radioaktiv-markiertes Menadion injiziert hatten. Beim Huhn werden maximal 1 % der verabreichten Menadionmenge in Menachinon-4 umgewandelt, bei der Ratte und anderen Säugern wesentlich weniger. Doch verläuft die Prothrombinsynthese offensichtlich abhängig von einer derartigen Umwandlung. Nach TAGGART und MATSCHINER (1969) reichen diese minimalen Mengen Menachinon-4 völlig zur Aufrechterhaltung eines "normalen" Prothrombinspiegels aus. Auch andere Autoren bestätigten die Umwandlung von Menadion und Phyllochinon zu Menachinon-4 (65,79,118,169).

LEV und MILFORD (1966, 1967) berichten von einem wasserlöslichen Faktor mit Vitamin K - Aktivität in Schweineleber, im endoplasmatischen Retikulum der Rattenleber und in Membranpräparationen von Mäuse-milz. Dieser Faktor erwies sich als hitzelabil und

stimulierte, wie andere Vitamin K - wirksame Substanzen, das Wachstum von *Fusiformis negrescens*. Die Struktur dieser Verbindung ist noch nicht bekannt. Die Autoren halten sie ebenfalls für eine aktive Form von Vitamin K im Organismus.

Weitere Veröffentlichungen in jüngster Zeit befassen sich mit den Vitamin K - Formen speziell in der Leber. MATSCHINER und AMELOTI (1968) isolierten aus Rinderleber die Menachinone-10, -11, -12. Sie fanden diese und zusätzlich Menachinon-13 auch im Panseninhalt (119). HAMILTON und DALLAM (1968) identifizierten in Schweine-, Hasen- und Kühenlebern ein 2-methyl-3,5-dehydrophytyl-1,4-naphthochinon, konnten die Herkunft aber nicht klären. MATSCHINER (1969) fand Phyllochinon als alleinige Vitamin K - Form in der Pferdeleber. DUELLO und MATSCHINER (1971) untersuchten die Leber von Hunden und wiesen dabei neben unverändertem Phyllochinon auch Menachinon-8, -9, -10, -11 und als Metaboliten Menachinon-4 und -5 nach. Das Herz enthielt nur Menachinon-4.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Vitamin K - Formen in der Leber hauptsächlich den im Darm absorbierten entsprechen und weniger von metabolischen Vorgängen abhängig sind.

Aufschluß über die letztlich im tierischen Organismus wirkende Form hätte bisher auch von der relativen biologischen Wirksamkeit der verschiedenen K-Vitamine erwartet werden können. So wäre denkbar, daß die Verbindung mit der höchsten Vitamin K - Aktivität der tatsächlichen Wirkform am ähnlichsten ist. Die Beobachtung, daß Vitamin K - Verbindungen mit 20 oder 25 C-Atomen in der Seitenkette bei oraler Verabreichung die biologisch wirksamsten sind (179), würde gut mit

den o.a. Ergebnissen von MARTIUS, MATSCHINER u.a. übereinstimmen. Als Grund dafür gilt aber eher deren bessere intestinale Absorbierbarkeit im Vergleich zu den langkettigeren, stark lipophilen Menachinonen als ihre strukturelle Ähnlichkeit mit der Wirkform im Organismus. MATSCHINER und TAGGART (1968) stellten nach intrakardialer Verabreichung an Ratten überraschend fest, daß die Menachinone-7, -8, -9 und -10 um das 10 - 25fache wirksamer waren als die Menachinone-4, -5, -6 und als Phyllochinon.

2.4.2. Wirkungsort

Als Ort der Vitamin K - Wirkung galt lange Zeit nur die Leber. Leberparenchymschäden, traumatische Leberschäden und die Entfernung der Leber führen zum Absinken der Vitamin K - abhängigen Gerinnungsproteine im Plasma, das durch Verabreichen von Vitamin K nicht verhindert werden kann (11,173). DAM et al. (1954,1955) fanden 70 % einer in emulgierter Form i.v. verabreichten Vitamin K - Menge in Leber und Milz wieder, in anderen Organen nur unbedeutende Mengen. Auch MATSCHINER und DOISY (1966) halten die Leber für das Organ des Säugtiers, das die höchsten Mengen Vitamin K enthält.

Wenn auch schon einige Untersuchungen gegen diese Annahmen sprachen (89,157), brachten die Versuche von MARTIUS (1956) und MARTIUS und ESSER (1958) neue Erkenntnisse. Demnach ist das Vitamin in nahezu allen Organen und Geweben zu finden, aber weniger in der applizierten Form (wie in der Leber), sondern in Form des Menachinon-4, das durch Austausch der Seitenkette im Organismus gebildet wird.

Es gilt heute als unwidersprochene Lehrmeinung, daß die

Vitamin K - abhängigen Gerinnungsproteine nur in der Leber gebildet werden. Den direkten Beweis dafür lieferten die Versuche von BARNHART (1960) und ANDERSON und BARNHART (1964) mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper des Prothrombins. Nur in den Leberparenchymzellen reagierte das (species-spezifische) fluoreszierende Antiprothrombin mit adäquaten Mengen neu gebildeten Prothrombins.

2.4.3. Biologische Bedeutung

Über die biologische Bedeutung der K-Vitamine gibt es derzeit im Prinzip zwei Theorien. Die eine ältere besagt, daß sich die Vitamin K - Wirkung auf die Bildung der Gerinnungsproteine in der Leber beschränkt. Die andere, zuerst von MARTIUS und NITZ-LITZOW (1954) aufgestellt, vermutet eine wesentlich fundamentalere Funktion im Zellstoffwechsel aller Organismen, ähnlich wie bei anderen Vitaminen. MARTIUS stützt sich dabei auf folgende Tatsachen und Indizien:

- 1.) Die Annahme, daß der Körper mit Hilfe von Verbindungen, die er nicht selbst produzieren kann, nur die Synthese einiger spezifischer Proteine reguliert, wirkt unwahrscheinlich, zumal diese Verbindungen von niederen Organismen (Bakterien, Pflanzen) produziert werden.
- 2.) Auch Avertebraten, welche über kein Blutgerinnungssystem verfügen, wandeln Menadion in Menachinon-4 um (116).
- 3.) Vitamin K läßt sich in allen Organen, in den relativ höchsten Konzentrationen nicht nur in der Leber, sondern auch im Nierengewebe und im Herzmuskel, nachweisen (111, 178).

MARTIUS vermutet auch aufgrund des Redox-Charakters der K-Vitamine eine Funktion innerhalb des Energiestoffwechsels der Zelle, zum Beispiel bei der oxidativen Phosphorylierung im Rahmen der Zellatmung (110,113). In Abwesenheit von Vitamin K oder seiner Verdrängung durch Vitamin K - Antagonisten würde dann u.a. auch die Fähigkeit, Proteine zu synthetisieren, eingeschränkt sein, wodurch die Gerinnungsproteine mit ihren kurzen biologischen Halbwertszeiten (6 - 60 Std.) am ersten betroffen wären. MARTIUS führte bereits 1954 als Bestätigung seiner Theorie an, daß in Lebermitochondrien von Vitamin K - Mangelküken ein relativ niedriger P/O-Quotient auftritt, welcher nach Zugabe von Phyllochinon wieder angehoben werden kann (114).

Eine Reihe von Untersuchern bemühte sich daraufhin, über den Vitamin K - Wirkungsmechanismus durch in-vitro-Versuche Aufklärung zu erhalten. CLARK und TODD (1961) zeigten als erste, daß bei Oxidation von Chinolphosphat in vitro ein "aktives Metaphosphat" entsteht, das mit Adenosinmonophosphat zur Bildung von Adenosindiphosphat führt. Zur selben Zeit fanden BRODIE (1961), RUSSELL und BRODIE (1961) sowie ASANO et al. (1962 a, 1962 b) Beweise, daß unter Einwirkung von Enzymen aus Phyllochinon das Naphthochromanylphosphat entstehen kann. Diese Verbindung gilt als Zwischenprodukt bei der oxidativen Phosphorylierung. ANDERSON und DALLAM (1959) sowie BEYER (1959) bestrahlten Lebermitochondrien von Ratten mit ultra-violettem Licht, um die lichtempfindliche Chinonbindung zu zerstören, und konnten die gestörte oxidative Phosphorylierung durch Gaben von Phyllochinon wiederherstellen.

Im Gegensatz dazu stehen Befunde (20), die nicht auf eine Beziehung zwischen oxidativer Phosphorylierung

in Mitochondrien von Küken und einen durch Vitamin K - Entzug erzeugten Prothrombinmangel hinweisen. PARMAR und LOWENTHAL (1961) bemerkten keine Hemmung der mitochondriellen oxidativen Phosphorylierung nach Verabreichung eines Vitamin K - Antagonisten. Auch PAOLUCCI et al. (1963) bestätigten diese Ergebnisse. Sie konnten weder ein enges P/O-Verhältnis durch Vitamin K - Gaben erweitern noch die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch Dicumarol mit Hilfe von Phylochinon umkehren.

Eine Reihe weiterer gegensätzlicher Versuchsergebnisse über das Vorhandensein und die Rolle von phosphorylierten Chinonen als Zwischenprodukte der oxidativen Phosphorylierung lassen noch keine abschließende Beurteilung zu. Es muß festgehalten werden, daß bis heute kein eindeutiger Beweis für eine allgemeine Rolle der Vitamin K - Verbindungen in der lebenden Zelle existiert, wenngleich sich in jüngster Zeit die Anzeichen dafür mehren (95).

2.4.4. Wirkungsmechanismus

Unabhängig von der Diskussion über die allgemeinere Bedeutung von Vitamin K besteht auch noch keine Klarheit über den genauen Wirkungsmechanismus von Vitamin K bei der Synthese der Gerinnungsproteine. Nach DAM (1966) kann man die bisher diskutierten Möglichkeiten über die Art der Vitamin K - Wirkung auf die Vitamin K - abhängigen Plasmafaktoren in vier Gruppen zusammenfassen:

1.) Vitamin K wird Bestandteil dieser Faktoren.

Diese von LYONS (1945) und RAY et al. (1962) vertretene Hypothese gilt inzwischen durch die Ergebnisse der Versuche von SOLVONUK et al. (1952) und TAYLOR et al. (1956) als eindeutig widerlegt. Bei der Verabreichung von radioaktiv-markiertem

Menadion bzw. Phyllochinon konnte in den neu gebildeten Vitamin K - abhängigen Gerinnungsproteinen keine Radioaktivität festgestellt werden.

- 2.) Vitamin K wirkt als Koenzym oder prosthetische Gruppe eines oder mehrerer Enzyme, die für die Biosynthese der plasmatischen Faktoren oder ihrer Vorstufen notwendig sind.

QUICK und COLLENTINE (1951) stellten diese Theorie auf, welche die meist vertretene ist.

- 3.) Vitamin K ist notwendig für die oxidative Phosphorylierung und deshalb auch für energieverbrauchende Biosynthesen.

Die Schwierigkeiten, diese, zuerst von MARTIUS und NITZ-LITZOW (1954) aufgestellte Hypothese zu untermauern, wurden schon unter B., 2.4.3. erwähnt.

- 4.) Vitamin K wirkt auf einer genetischen Stufe, indem es indirekt die Wirkung eines Regulatorgens kontrolliert, welches die Synthese der plasmatischen Faktoren bewirkt (genetische Derepression).

Diese Hypothese stammt von OLSON (1964) und basiert auf Beobachtungen, daß Actinomycin D, welches die Ribonukleinsäure-Synthese in der Leber hemmt, auch der Vitamin K - induzierten Prothrombinsynthese entgegenwirkt. Nachdem aber weder SUTTIE (1967), noch HILL et al. (1968), noch LOWENTHAL und SIMMONS (1967) diesen Effekt bei ähnlichen Versuchen bestätigen konnten, wandte sich auch OLSON wieder von seiner Hypothese ab (140).

In jüngster Zeit wurde in einer Vielzahl von Veröffentlichungen über den entscheidenden Punkt des Eingreifens von Vitamin K im proteinsynthetisierenden System der Leberzelle diskutiert.

Es gibt im wesentlichen zwei konträre Meinungen:

- 1.) Vitamin K aktiviert Vorstufen der Gerinnungsproteine (Präproteine, Precursor proteins), die selbst wiederum unabhängig von Vitamin K gebildet werden.
- 2.) Vitamin K stimuliert direkt oder indirekt die Synthese der Gerinnungsproteine aus dem Pool der freien Aminosäuren (sog. "de- novo - Synthese"), d.h., es wirkt auf einer ribosomalen Stufe.

HEMKER fand 1966 einen Hemmfaktor der Thrombinbildung bei Patienten, die an Vitamin K - Mangel litten bzw. mit Antikoagulantien behandelt worden waren. Bei dem Faktor handelte es sich um ein Protein, das in der Leber synthetisiert wird und starke Ähnlichkeit mit den Vitamin K - abhängigen Proteinen hat. Weitere Proteine dieser Art wurden in der Folgezeit entdeckt (73,84,88,160,162,164,172). Es wird vermutet, daß es sich dabei um Vorstufen der Gerinnungsproteine handelt, deren Synthese infolge des Vitamin K - Mangels nicht vervollständigt wurde. Sie wurden PIVKA (Protein induced by vitamin K absence and antagonists) genannt.

Am weitesten erforscht ist das zuerst von STENFLO und GANROT (1972) aus Rinderplasma isolierte "anormale Prothrombin". Nach seiner weitgehender Reindarstellung machten STENFLO (1972), STENFLO und GANROT (1972) sowie NELSESTUEN und SUTTIE (1972) eine Reihe interessanter Beobachtungen. "Anormales Prothrombin" nimmt in dem Maße im Plasma von dicumarolbehandelten Tieren zu, wie die Konzentration des Prothrombins abnimmt. Es zeigt Kreuzreaktionen mit einem Prothrombin-Antikörper; es ist immunologisch identisch mit Prothrombin. Aminosäuren und Kohlenhydratzusammensetzung sowie Molekulargewichte beider Proteine (des Prothrombins sowie des "anormalen Prothrombins") scheinen ebenfalls

identisch zu sein. Das "anormale Prothrombin" wird aber nicht von Bariumsalzen adsorbiert und bindet weniger Ca-Ionen als Prothrombin, worin SUTTIE (1973 a) die Ursache für dessen Inaktivität (bei der Blutgerinnung) sieht. Mit Hilfe eines Schlangengifts, mit dem SUTTIE (1973 b) schon das "anormale Prothrombin" des Rindes aktivieren konnte, gelang es auch, in einem Mikrosomenextrakt von warfarinisierten Ratten, der vorher keine Prothrombinaktivität zeigte, eine schnelle Gerinnung herbeizuführen, woraus auf das Vorhandensein eines Präprothrombins geschlossen wird.

Diese Schlußfolgerung wird durch folgende Beobachtung von SHAH und SUTTIE (1971) gestützt:

Nach gleichzeitiger Verabreichung von radioaktiv-markierten Aminosäuren und Vitamin K an hypoprothrombinämische Ratten wurde, trotz Anwesenheit von Cycloheximid Prothrombin neu gebildet, welches aber kein neu synthetisiertes Protein enthielt. (Cycloheximid hemmt normalerweise fast vollständig die Inkorporierung von Aminosäuren in Plasma- und Gewebsproteine.) Prothrombin muß also aus einem vorher vorhandenen "Precursor Pool" gebildet worden sein.

Mit der Annahme, daß die Gerinnungsproteine in Form von Vorstufen in der Leber vorhanden sind, ist aber der "vitaminsensitive" Schritt noch nicht geklärt. Folgende Möglichkeiten der Aktivierung der Präproteine durch Vitamin K werden diskutiert:

- a.) Inkorporierung des Glukosamins (146)
- b.) Anhängen eines Kohlenhydratrestes (85)
- c.) Bildung der kalziumbindenden Stelle (166)
- d.) Modifikation der dreidimensionalen Molekülstruktur (166)

Nach SUTTIE (1973 a) sprechen die verfügbaren Daten am ehesten für eine Vitamin K - Wirkung durch einen metabolischen Schritt, welcher das Präprotein durch Bildung der kalziumbindenden Stelle, die ihrerseits für die normale Aktivierung (bei der Blutgerinnung) notwendig ist, modifiziert. Eine anschließende Glykolyisierung führe dann zum aktiven Protein.

NELSESTUEN und SUTTIE (1972 b) beobachteten, daß "anormales Prothrombin" (bei einer Konzentration von 1 mM Ca) nur sehr wenig Calcium, normales Prothrombin dagegen ca. 4 Ca-Atome pro Mol Prothrombin bindet. Nach SUTTIE (1973 a) ist diese Calcium-Bindung an Prothrombin als kooperativer Effekt aufzufassen, welcher auf einen strukturellen Wechsel während der Calcium-Bindung hinweist.

Dem widersprechen einige Autoren, die Hinweise für eine Wirkung von Vitamin K auf der Ribosomenstufe erhalten hatten. Als Möglichkeit, um diese Theorie von derjenigen der Präproteine zu differenzieren, wird der Nachweis einer "de-novo-Synthese" der Gerinnungsfaktoren unter dem Einfluß von Vitamin K angesehen. LI et al. (1970) und OLSON et al. (1969) beobachteten in perfundierten Lebern, die sie warfarinisierten Ratten entnahmen, daß die Zugabe von Phyllochinon zu einem rapiden Anstieg des Prothrombinspiegels führte. Hierbei wurde radioaktiv-markiertes Algenhydrolysat und Leucin in einem solchen Ausmaß in das neugebildete Prothrombin inkorporiert, daß der Schluß auf eine Prothrombin-Synthese aus dem freien Aminosäurepool des hepatischen Gewebes nahelag.

JOHNSTON und OLSON (1972 a und 1972 b) beschrieben ein Mitochondriensystem aus Rattenleber, das radioaktives Leucin in Proteine inkorporiert, die durch

Antikörper gegen Rattenprothrombin gefällt werden können. Das Ausmaß der Inkorporationsrate ist bei Mitochondrien von Vitamin K - Mangelratten wesentlich geringer ausgeprägt, nach Vitamin K - Gaben kurz vor der Tötung aber etwa doppelt so hoch wie bei der normalen Ratte. Die erhöhte Inkorporationsrate kehrte erst dann zur Norm zurück, wenn sich der Plasmaspiegel des Prothrombins normalisiert hatte. Die Autoren erklären die gesteigerte Inkorporationsrate als Folge einer Zunahme der Polysomen, die messenger-Ribonukleinsäure für Prothrombin tragen. Vitamin K soll mit einem bisher undefinierten Regulatorprotein reagieren, das dann in die Interaktion von messenger-Ribonukleinsäure und Ribosom einbezogen wird.

SUTTIE (1969) verfolgte bei Versuchen mit warfarinisierten Hunden die Inkorporation radioaktiver Aminosäuren in Prothrombin nach Injektion von Vitamin K. Die spezifische Aktivität des Prothrombins übertraf den korrespondierenden Wert von Kontrolltieren (ohne Vitamin K) deutlich.

Als mögliche Erklärung für diese Befunde wie auch für die Ergebnisse der Versuche von OLSON's Gruppe wurden von SUTTIE (1973 a) angeführt, daß die Mikrosomen hypoprothrombinämischer Tiere nach Applikation von Vitamin K in erhöhtem Maße Prothrombin synthetisieren können. Er vergleicht dies mit Albumin, wo durch Hypoalbuminämie ebenfalls die Synthese des Albumins gesteigert werden konnte, und hält diesen "feed-back"-Mechanismus für eine von Vitamin K unbeflußte Art der Regulierung des normalerweise nur in sehr engen Grenzen schwankenden Prothrombinspiegels.

2.4.5. Bedarfsdeckung

Die wichtigste Vitamin K - Quelle des Säugers ist seine eigene Darmflora (1, 4), besonders *Escherichia coli* (9, 141). Die Produktion durch die Mikroorganismen reicht gewöhnlich aus, um den Bedarf, selbst bei fehlender Zufuhr mit der Nahrung, zu decken. Beim Junggeflügel dagegen genügt, wahrscheinlich infolge des relativ kurzen Dickdarms, die Menge des bakteriell produzierten Vitamins nicht. Es ist deshalb auf die Zufuhr mit der Nahrung angewiesen (134). Legehennen in Bodenhaltung können ihren Vitamin K - Bedarf vollständig durch enterale Synthese decken (171).

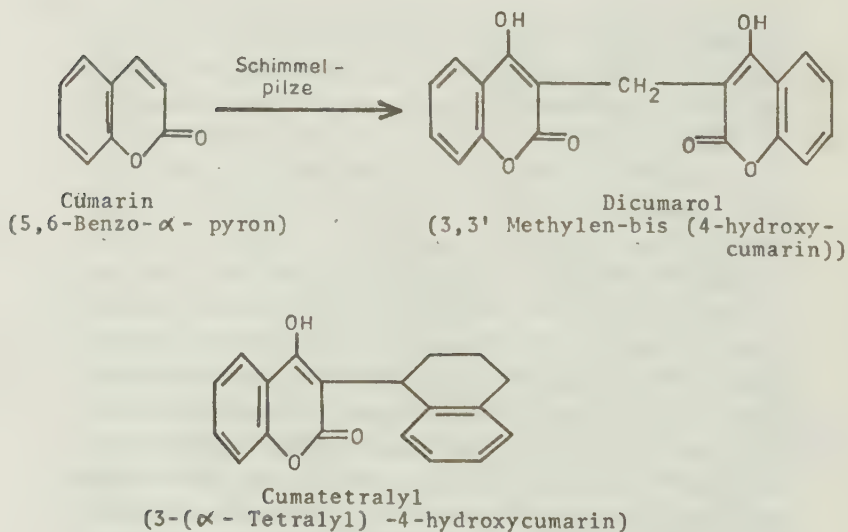
Es ist noch unklar, ob und inwieweit enteral gebildetes Vitamin K am Ort der Synthese resorbiert wird und/oder erst durch Koprophagie (mit nachfolgender Resorption im Dünndarm) für das Tier verfügbar gemacht wird.

Der Bedarf des Kükens (0 - 8 Wochen alt) wird vom National Research Council (NRC) (129) mit 530 mcg Phyllochinon/kg Futter angegeben. NELSON und NORRIS (1960, 1961) geben den Bedarf des zwei bis vier Wochen alten Kükens mit 520 mcg Phyllochinon, 590 mcg Menadion bzw. 310 mcg MSB je kg Futter an. Nach GRIMINGER und DONIS (1960) sind 1 mg Phyllochinon, 1,15 mg Menadion bzw. 1,45 mg MSBC pro kg Futter für das drei Wochen alte Küken notwendig, um einen normalen Prothrombinspiegel im Blut zu erreichen. Bei Puten bis zum Alter von vier Wochen gelten 1700 mcg Menadion bzw. 600 mcg MSB/kg Futter als bedarfsdeckend.

3. Vitamin K - Antagonisten

Der erste und bekannteste Vitamin K - Antagonist, das Dicumarol, wurde 1941 von CAMPBELL und LINK identifiziert. Sie fanden es als auslösenden Faktor der Süßkleeerkrankung (sweet clover disease), die bei Rindern zu schweren Blutungen mit Todesfolge führen kann und erstmals 1921 aus Kanada berichtet wurde. Dicumarol wird in Steinkleearten unter dem Einfluß von Schimmelpilzen aus Cumarin gebildet (Abb. 5).

Abb. 5 - Cumarin / Dicumarol / Cumatetralyl



Die Entwicklung und Erforschung einer Vielzahl von synthetischen Vitamin K - Antagonisten in den letzten 25 Jahren hatte auch entscheidende Bedeutung für die Vitamin K - Forschung.

Die Vitamin K - Antagonisten haben keinen direkten Angriffspunkt im Gerinnungssystem innerhalb der Blutbahn und werden daher auch als indirekte Antikoagulantien bezeichnet (147). Nachdem sie die Bildung derselben Gerinnungsproteine hemmen, die auch im Vitamin K - Mangel betroffen sind (und nur diese), wird vermutet, daß sie Vitamin K von dessen Wirkungsort verdrängen und damit die Synthese oder Aktivierung der Vitamin K - abhängigen Gerinnungsproteine in der Leber verhindern (159,177). Ihr genauer Wirkungsmechanismus ist ebenso unklar wie der von Vitamin K. Bis vor kurzem nahm man an, daß die Wirkung der Antikoagulantien vom Cumarintyp auf einer "einfachen" kompetitiven Hemmung beruhe. Nach neuesten Untersuchungen von BELL et al. (1972) scheint diese Wirkung aber komplexer zu sein. Nach Phyllochinon-Injektionen an warfarinisierten Ratten stieg das Verhältnis von Phyllochinonoxid zu Phyllochinon etwa um das 8fache an. Da geringe Mengen Vitamin K auch in der Leber unbehandelter Ratten in Form des Phyllochinonoxids nachgewiesen wurden, besteht die Möglichkeit, daß das Phyllochinonoxid ein Zwischenprodukt bei der Bildung der im Organismus wirksamen Vitamin K - Form ist. Die genannten Autoren sind der Meinung, daß möglicherweise die Wirkung der Cumarinderivate auf einer Erhöhung der Phyllochinonoxid-Konzentration beruht; das Phyllochinonoxid ist dann der eigentlich Phyllochinon kompetitiv verdrängende Vitamin K - Antagonist.

Bei folgenden Gruppen chemischer Verbindungen hat man bis heute einen echten Vitamin K - Antagonismus festgestellt:

- 1.) Cumarinderivate
- 2.) Indandione
- 3.) bestimmte Naphthochinonderivate
- 4.) Sulfonamide
- 5.) Antibiotika

Der kompetitive Wirkungsmechanismus scheint indes allein für die unter 1.) - 3.) genannten Substanzgruppen zuzutreffen.

Die Sulfonamidwirkung wird dagegen wesentlich komplexer aufgefaßt. Einige Autoren konnten eine schädigende Wirkung der Sulfonamide auf die zellulären Bestandteile des Bluts (Thrombo-, Leuko- und Erythrozyten) nachweisen (49,128,153,168). DORN (1965) hält die starke toxische Thrombopenie, bei der es sich um eine Schädigung des Hämostase-Mechanismus mit Angriffspunkt im Bereich der 1. Phase der Blutgerinnung handelt, als Hauptursache der Gerinnungsstörungen. Eine Hemmung der Vitamin K - produzierenden Coli-Flora ist zumindest beim Huhn von untergeordneter Bedeutung, da dessen intestinale mikrobielle Vitamin K - Synthese ohnehin den Bedarf nicht deckt (62,127,132). Ohne Zweifel besteht aber auch für Sulfonamide ein echter Antagonismus zu Vitamin K an dessen Angriffspunkt in der Leber (24,49,94).

Auch für einige Antibiotika, z.B. Cycloheximid (17,93,98,165), Puromycin (140,163) wurde eine Vitamin K - Hemmung in der Leber bewiesen.

Die Vitamin K - Antagonisten haben zunehmend Bedeutung erlangt. Coumarine und Indandione werden in der Antikoagulantientherapie bei den thrombotischen Erkrankungen des Menschen verwendet. Sie haben gegenüber Heparin und Heparinoiden, der anderen Gruppe von Antikoagulantien, einige Vorteile:

Man kann sie oral statt parenteral verabreichen; sie eignen sich zur Kurzzeitbehandlung und Langzeitprophylaxe; besonders die Cumarinderivate sind in der Langzeitbehandlung besser verträglich (82).

Einige Cumarin-Präparate (Warfarin, Racumin usw.) werden seit 1948 als Rattengifte erfolgreich eingesetzt.

Ihre besonderen Eigenschaften brachten der Forschung auch eine Fülle neuer Erkenntnisse über das Vitamin K.

Die in jüngster Zeit zunehmende Bedeutung der Antibiotika und Sulfonamide als Vitamin K - Antagonisten beruht auch auf ihrem vermehrten Einsatz. In Geflügelrationen müssen oft Sulfonamide als Coccidiostatika eingemischt werden, die dann den Vitamin K - Bedarf um ein Vielfaches erhöhen können.

Die Vitamin K - Antagonisten variieren untereinander erheblich, sowohl in ihrer Wirkungsdauer (176), als auch in der Schwere der durch sie ausgelösten Folgen (45,155). Außerdem bestehen große tierartliche Unterschiede (45,176).

Die verschiedenen Vitamin K - aktiven Substanzen sind nach den bisher vorliegenden Ergebnissen im präventiven Test, z.B. als Futterzusatz, sehr unterschiedlich wirksam gegen die Antagonisten. Phyllochinon ist unter diesen Bedingungen auf molarer Basis viel wirksamer als Menadion und seine Analoge, wenn z.B. das Futter Sulfaquinoxalin enthält (64,66,133). Gegen Antikoagulantien vom Cumarintyp sind praktisch nur Phyllochinon und Menachinone wirksam. Menadion und seine verwandten Substanzen sind (im präventiven Test) auch in hohen Dosen nahezu unwirksam (29,56, 62,64,80,106,125,126). Dies führt GRIMINGER (1965 a) auf eine quantitative Begrenzung der intrazellulären Synthese von biologisch aktivem Vitamin K (wahrscheinlich Menachinon-4) zurück. Für die Wirkung als Antidot ist

offensichtlich neben einer intakten 2-methyl-1,4-naphthochinon-Struktur auch eine fettlösliche Seitenkette am C-Atom 3 notwendig (104).

Im kurativen Test dagegen (z.B. beim Überwinden einer durch Vitamin K - Mangel hervorgerufenen Hypoprothrombinämie) sind Phyllochinon und Menadion auf molarer Basis nahezu gleich wirksam (42,51,56,62,64,80).

4. Methoden der Vitamin K - Bestimmung im biologischen Testverfahren

4.1. Grundlagen

Sämtliche biologischen Bestimmungsmethoden basieren auf der Wirkung von Vitamin K im Ablauf der Blutgerinnung. Voraussetzung ist, daß am Versuchstier ein kontrollierbar verlaufender Vitamin K - Mangel experimentell erzeugt werden kann. Die Normalisierung bzw. Änderung der daraus resultierenden verlängerten Gerinnungszeiten des Blutes läßt dann in der Regel auf den Vitamin K - Gehalt der Probe im Vergleich zu Standardpräparaten schließen.

Da die Mehrzahl der Faktoren im Ablauf der Blutgerinnung nicht von Vitamin K abhängig ist, sind Gesamtgerinnungszeit-Bestimmungen als biologische Parameter wenig geeignet. Es erscheint daher zweckmäßig, eine Teilreaktion des Gerinnungsablaufs herauszugreifen, an der möglichst viele Vitamin K - abhängige und möglichst wenig Vitamin K - unabhängige Faktoren beteiligt sind, so daß der Einfluß Vitamin K - unabhängiger Faktoren weitgehend ausgeschaltet ist oder vernachlässigt werden kann. Als abhängig von der Vitamin K - Versorgung gilt die enzymatische Umwandlung des Prothrombins in Thrombin. Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, wird heute als Thromboplastinzeit (früher Prothrombinzeit) bezeichnet.

Das Prinzip der von QUICK (1935) inaugurierten "Einstufenprothrombinzeitbestimmung" wird noch heute bei den meisten Gerinnungsanalysen angewandt. Man gibt die bekannten Faktoren (Ca-Ionen, Thromboplastin) im Überschuß dem Ansatz zu und erhält dann eine Gerinnungszeit, die von den zu bestimmenden Faktoren abhängt. Auf die Thromboplastinzeit haben alle an der 2. Phase beteiligten Faktoren Einfluß, nämlich Thrombokinese, Ca-Ionen, Faktor V, VII, X und Prothrombin. Darüber hinaus beeinflußt auch eine ausgeprägte Fibrinogenopenie- Fibrinogenverminderung unter 25 % der Norm (90) - die Thromboplastinzeit. Die in der ersten Phase der Blutgerinnung wirksamen Faktoren zur Blutthrombokinesebildung werden durch Zugabe von Gewebsthrombokinese überdeckt (49). Der Einfluß der Ca-Ionen ist durch deren Zugabe im Überschuß für jeden Testansatz gleich groß. Es wird somit bei diesem Test der Gehalt von drei der vier Vitamin K - abhängigen Gerinnungsfaktoren erfaßt. Lediglich Faktor V und eine evtl. Fibrinogenopenie stellen wenn auch sehr geringe Unsicherheitsfaktoren dar. Dieser Test hat deshalb bei der Mehrzahl der Untersuchungen über die Vitamin K - Versorgung (und damit den Vitamin K - Gehalt einer Probe) Anwendung gefunden. Er läßt allerdings weite Möglichkeiten für Variationen im Detail offen.

Daneben könnte auch eine Bestimmung einzelner Vitamin K - abhängiger Faktoren zu brauchbaren Ergebnissen führen. Nach PAKOSTA (1970), HENNE (1967) sowie JOCHIMS (1962) verhalten sich zumindest die Faktoren II, VII und X entsprechend der Thromboplastinzeit. Unter Sulfonamid- bzw. Dicumarolbelastung soll dies nach DORN (1965) und DEUTSCH (1955) nicht mehr der Fall sein. Der versuchstechnische Aufwand dürfte aber größer als bei der Thromboplastinzeit-Bestimmung sein. Individuelle Schwankungen erhöhen hier die Fehlerbreite ungemein.

4.2 Thrombokinasen (= Thromboplastin)

Die Zugabe von Gewebsthrombokinase ist, wie oben bereits erwähnt, wichtiger Bestandteil im QUICK'schen Modell der Thromboplastinzeit-Bestimmung. Dabei treten einige Schwierigkeiten und Probleme auf:

- 1.) Die Gewebsextrakte sind artspezifisch (77, 102), d.h. beste Beschleunigung der Blutgerinnung einer bestimmten Tierart läßt sich nur mit Thrombokinase aus Geweben der gleichen Art (homologe Thrombokinase) erzielen. Thrombokinase anderer Arten (heterologe Thrombokinase) führen zum Teil zu erheblichen Verzögerungen des Gerinnungsablaufs.
- 2.) Die Gewebsextrakte sind gewebsspezifisch (61, 149), d.h. die Beschleunigung der Blutgerinnung hängt auch von den verwendeten Geweben ab, wenn auch nicht in dem Maße wie bei der Verwendung von heterologen Thrombokinase. So bringt z.B. die Verwendung von Hirnthrombokinase kürzere Gerinnungszeiten als Lungen-, Muskulatur- oder Embryothrombokinase. JAENECKE (1971) hält die unterschiedliche Thrombokinaseaktivität der Gewebe für eine Art Notfallsprinzip. Sie ist im übrigen immer dort besonders hoch, wo Blutungen lebensbedrohend sein können.
- 3.) Die Aktivität des Thromboplastins ist abhängig vom Vitamin K-Status des Tieres (67). Zu Thromboplastin verarbeitete Gehirne von Vitamin K-Mangel-Küken brachten eine signifikante Verlängerung der Thromboplastinzeiten im Vergleich zu solchen von Tieren mit

ausreichender Vitamin K - Versorgung. Als Hauptsache für diese Aktivitätsminderung halten GRIMINGER et al. (1970) die Senkung des Gehalts von Faktor VII und X im verbleibenden Restblutanteil des Gehirnkonzentrats. Beide Faktoren spielen ja bei der Aktivierung der Gewebsthrombokinase eine wichtige Rolle.

- 4.) Die Aktivität des Thromboplastins ist abhängig vom Alter der zu seiner Herstellung verwendeten Tiere. Nach DORN (1965) ist das Kükenhirnthromboplastin von Eintagsküken aktiver als solches von älteren Tieren.
- 5.) Eine Reihe weiterer Faktoren beeinflussen die Aktivität mehr oder weniger deutlich, so z.B. die Methodik der Herstellung, die Art und Dauer der Lagerung und die Wasserbadtemperatur während der Thromboplastinzeitbestimmungen.

Selbst bei Einhaltung eines in allen Punkten konstanten Herstellungsschemas ist es kaum möglich, ein standardisiertes Thromboplastin zu erhalten. Folglich können Thromboplastinzeiten von verschiedenen Autoren und Thromboplastinchargen, die in Sekunden angegeben werden, nur bedingt miteinander verglichen werden.

Durch Anlegen einer Eichkurve für jede Thromboplastincharge mit Mischplasmaverdünnungen können die Thromboplastinzeiten in QUICK- $\frac{1}{2}$ -Werten ausgedrückt werden, die einen Vergleich verschiedener Untersuchungsreihen ermöglichen.

4.3. Vorhandene Modelle zur Vitamin K - Bestimmung im biologischen Testverfahren

Das erste Testverfahren geht auf Arbeiten von SCHÖNHEYDER (1936) zurück und wurde 1938 von DAM und GLAVIND wesentlich überarbeitet. Die genannten Autoren verwendeten die

curative Testmethode, d.h., sie bestimmten die kleinste Menge Vitamin K, welche die zuvor experimentell erzeugte Avitaminose gerade noch zu heilen vermochte. Ihr Standardpräparat war Spinat, den sie in Tablettenform an drei aufeinanderfolgenden Tagen an Vitamin K - depletierte Küken verabreichten, deren Plasmagerinnungszeit (Methode nach FISCHER (1930)) sie vorher festgestellt hatten. Am 4. Tag erfolgte dann die 2. Gerinnungsbestimmung. Zusätzlich wurden die Tiere täglich gewogen und das mittlere Gewicht der Versuchsperiode ermittelt. Durch Erstellen eines Diagramms fanden DAM und GLAVIND (1938), daß 2 mg ihres sog. Standardspinats pro g Körpergewicht und pro Tag (= 1 Einheit) zu normalen Gerinnungszeiten führten. Der Vitamin K - Gehalt irgendeiner anderen Substanz wurde dann in Einheiten (entsprechend dem Standardpräparat Spinat) ausgedrückt.

Zur Bestimmung der Gerinnungszeit wurde dabei Blut aus der A. carotis des betreffenden Tieres entnommen, zentrifugiert und das Plasma mit gleichen Teilen Ringer-Lösung versetzt. Thromboplastin, das aus der weißen Brustmuskulatur von Hühnern hergestellt war, wurde zugefügt (Wasserbadtemperatur: 39 ° Celsius). Gerinnungszeiten bis zu 3 Minuten galten als normal.

In der Folgezeit erfuhr diese Methode eine Reihe von Modifikationen. 1950 veröffentlichten DAM et al. ein verbessertes Verfahren: Eintagsküken erhalten 10 Tage Normalfutter. Danach werden sie auf Vitamin K - freie Diät umgestellt. Koprophagie wird durch tägliche Reinigung der Käfige, Tränken und Tröge verhindert. Nach 4-6 Wochen Vitamin K - freier Ernährung wird die Gerinnungszeit gemessen, ebenso wie die eines gleichzeitig normal ernährten Kükens. Küken, in deren Plasma das 4 - 7fache der normalen Gerinnungszeit gemessen wird, erhalten anschließend die Test-Substanzen mit fraglichem Vitamin K - Gehalt. Umfangreicheres Material wird in Tablettenform,

Konzentrate oder Reinsubstanzen werden in Lösungsmitteln verabreicht. Menadion in öliger Lösung dient als Standardsubstanz. 20 - 22 Stunden nach Einnahme der Testsubstanz wird erneut Blut genommen. Die gemessene Gerinnungszeit wird in % der Norm ausgedrückt. An einer Eichkurve, welche die Autoren durch Verabreichung verschiedener Dosen Menadion erstellten, läßt sich dann der Vitamin K - Gehalt der Testsubstanz bezogen auf Menadion als Standardsubstanz errechnen.

Die Autoren weisen darauf hin, daß stabilere Standardpräparate vorteilhafter wären. Sie schließen nicht aus, daß der Vitamin K - Gehalt zweier Substanzen bei unterschiedlichem Intervall zwischen 1. und 2. Blutentnahme schwanken kann, da die verschiedenen Vitamin K - aktiven Substanzen möglicherweise nicht genau im gleichen Zeitraum und im gleichen Maße metabolisiert werden.

Davon unterscheiden sich nicht wesentlich die von den meisten amerikanischen Autoren bevorzugten Testmethoden. In der Regel werden Eintagsküken einer Mastrasse eine Woche lang mit einer Vitamin K - armen Mais-Soja-Ration gefüttert. Daran schließt sich eine 2 - 4wöchige Periode an, in der die Tiere die Testrationen erhalten. Zur Sensibilisierung des Testes wird ein Vitamin K - Antagonist, in der Regel Sulfaquinoxalin, seltener ein Cumarinabkömmling, eingemischt. Ein oder zweimal während der Testperiode wird meist mittels Herzpunktion Blut entnommen (53,59,62). Die Thromboplastinzeit-Bestimmungen variieren in fast allen Details, wobei eine Wasserbadtemperatur von 37-39 Grad Celsius bevorzugt wird (51,59). Die Ergebnisse werden in einem Koordinatensystem abgelesen, bei dem die Ordinate entweder den Logarithmus der Thromboplastinzeit (30,51) oder den reziproken Wert der Thromboplastinzeit $\times 1000$ (59,61,62,133,145) darstellt. Auf der Abszisse ist der Logarithmus der Standardsubstanz (mcg oder mg je kg Futter) aufgetragen. (Auch hier ist die Erfassung

des Vitamin K - Gehalts von Mischfutterproben nicht Gegenstand der Versuche und dürfte auch kaum möglich sein.)

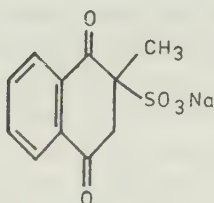
4.4. Standardpräparate

Wie aus 4.3. ersichtlich, beruhen alle biologischen Testverfahren auf dem Vergleich der zu bestimmenden Vitamin K - Aktivität gegenüber einem Standardpräparat. Als solches diente in den ersten Testverfahren getrockneter Spinat in Tablettenform (38). Vor allem DAM mit seiner nach ihm benannten Einheit war es dann, der Phyllochinon als Bezugsgröße einführte. Später übernahm das Menadion diese Funktion (39), da es leichter und billig herzustellen war. Menadion hat aber auch schwerwiegende Nachteile:

- 1.) Es ist nicht lichtbeständig.
- 2.) Es verbindet sich mit verschiedenen Futtermittelbestandteilen, speziell Proteinen.
- 3.) Es wird durch einige Fabrikationsvorgänge zerstört.
- 4.) Es benötigt ausreichende Gallenmengen zur Resorption.
- 5.) Es reizt Haut und Atmungstrakt.

Einige dieser Nachteile wurden durch die Einführung von MSB (Abb. 6), einem synthetischen, wasserlöslichen Menadionabkömmling, eliminiert. Auch MSB zerfällt jedoch in Vormischungen bei längerer Lagerung; in Futtermischungen wird die Aktivitätsabnahme noch beschleunigt. Allerdings bestehen hinsichtlich der Stabilität verschiedener MSB-Präparate offensichtlich erhebliche Unterschiede (31,68), die möglicherweise mit verschiedenen Herstellungsverfahren in Zusammenhang stehen.

Abb. 6 - Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB)



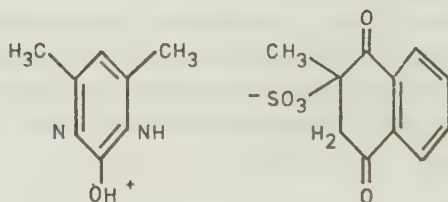
Die Einführung von MSBC, hier ist Menadion durch einen Bisulfitüberschuß stabilisiert, bedeutete eine merkliche Verbesserung. MSBC wurde deshalb von der ANRC (Animal Nutrition Research Council) als Standardpräparat für die biologisch wirksame Vitamin K - Aktivität empfohlen. Es ist im Konzentrat unverändert stabil, besitzt eine geringe Reizwirkung und wird auch ohne Galle resorbiert. In Reinform ist es stabil gegen Licht, Luft und Hitze. Im Futtermittel geht jedoch durch Einflüsse von alkalischen Mineralien sowie durch Hitze, Feuchtigkeit und Druck (z.B. im Verlauf des Pelletierens) relativ viel Vitamin K - Aktivität verloren.

Als derzeit stabilste Verbindung mit hoher Vitamin K - Aktivität gilt das MPB (31,43) (Abb. 7). Als Salz einer schwachen Base (Dimethylpyrimidinol) und einer starken Säure (Bisulfit) reagiert es in wäßriger Lösung sauer und weist somit im Gegensatz zu MSB eine Pufferkapazität auf. MPB ist nach DAY (1967) sowie CHARLES und HUSTON (1970) bei längerer Lagerzeit, in alkalischen Vormischungen, Vitaminvormischungen, Futtergemischen, nach dem Pelletieren, nach Hitze-, Feuchtigkeits- und Druckbelastung in der Stabilität dem MSBC überlegen. Außerdem soll der Pyrimidinol-anteil des Moleküls die Vitamin K - Aktivität von Menadion verstärken (43,51,63).

Hinsichtlich der Verkürzung erhöhter Thromboplastinzeiten war MPB auf gleiches Gewicht bezogen etwa doppelt so wirksam wie MSBC. Das Verhältnis von MSBC-Menadion zu MPB-Menadion beträgt aber lediglich 1 : 1,37. Bei Verwendung von Dicumarol als Stressagens fanden CHARLES et al. (1968) eine 10,4-bzw. 2,54fache Wirksamkeit des MPB gegenüber MSBC bei weiblichen bzw. männlichen Kühen, auf Gewichtsbasis bezogen.

Es muß allerdings betont werden, daß alle genannten Autoren ein handelsübliches Präparat, genannt Hetrazeen^{x)}, als MPB-Quelle benutzten. Dieses Präparat besteht nach Angaben des Herstellers nur zu etwa 50 % aus MPB. Der Rest sind "stabilisierende Getreideträger und saure Salze", wodurch "intramolekulare und extramolekulare Stabilisation" gewährleistet sein sollen.

Abb. 7 - Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit (MPB)



Die Stabilität des Standardpräparates ist eine wesentliche Voraussetzung der Aussagekraft eines biologischen Testverfahrens. Möglicherweise liegt hier eine Ursache für die sehr unterschiedlichen und sich manchmal widersprechenden Versuchsergebnisse einiger Autoren bei sonst ähnlichen Versuchsbedingungen.

x) Produkt der Firma Heterochemicals, New York

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Das im folgenden entwickelte und beschriebene biologische Verfahren zur Bestimmung auch kleinster Vitamin K - Aktivitäten lehnt sich an die im vorigen Kapitel beschriebenen Methoden an.

In umfangreichen Voruntersuchungen an über 600 Einzelblutproben aus z.T. unterschiedlich vorbehandeltem Tiermaterial sollten vier Fragestellungen vorab geklärt werden:

- 1.) Tiermaterial
- 2.) Alter bei Blutentnahme
- 3.) Art der Depletion
- 4.) Thromboplastinzeit-Bestimmung

Die einleitenden Untersuchungen, auf die im einzelnen hier nicht eingegangen werden soll, ergaben, daß schnellwachsende Broilerküken für die geplanten Versuche besser geeignet sind als Küken einer Legerasse. Zur Begründung kann angeführt werden, daß bei Broilerküken aufgrund ihrer höheren Wachstumsrate schneller mit einer Vitamin K - Depletion gerechnet werden darf, daß bei ihnen aus demselben Grund voraussichtlich die Gewichtsentwicklung als Hilfskriterium (zur Stützung der sich aus den Thromboplastinzeiten ergebenden Schlußfolgerungen) herangezogen werden könnte. Weiter ist eine schnelle und sichere Blutentnahme ohne Verunreinigungen mit "extrinsic-Faktor" erst ab ca. 400 g Körpergewicht möglich, was bei Broilerküken innerhalb einer kürzeren Zeitspanne erreicht wird.

Die notwendige Depletionsdauer war vorwiegend durch den Zeitraum bestimmt, innerhalb dessen das bereits genannte versuchstechnisch bedingte Mindestkörpergewicht von ca. 400 g erreicht wurde. Daher konnte nicht geklärt werden, ob eine für die Versuchszwecke ausreichende Vitamin K -

Depletion etwa bereits früher (als ca. 4 Wochen) erreicht werden könnte. Mit Hilfe von Vitamin K - Antagonisten kann die Depletionsdauer - etwa bei älteren Tieren - erheblich verkürzt werden. Es sollte daher in Versuch II untersucht werden, ob im Rahmen des angewandten Testmodells eine Depletion mit einem Vitamin K - Antagonisten gegenüber einer Depletion ohne Verwendung solcher Substanzen Vorteile erbringt.

Unter den geprüften Vitamin K - Antagonisten Sulfaquinoxalin, Dicumarol und Cumatetralyl erwies sich letzteres auf Substanzgewicht bezogen als am wirksamsten. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen ausschließlich Cumatetralyl als Vitamin K - Antagonist verwendet.

Die ursprünglich beabsichtigte Art der Versuchsdurchführung, unterschiedlich hohe Vitamin K - Zusätze ohne gleichzeitige Gabe eines Vitamin K - Antagonisten zu untersuchen, wobei Cumatetralyl ausschließlich in der Depletionsperiode (= Vorperiode) verabreicht werden sollte, erwies sich als nicht praktikabel. Unter diesen Bedingungen kehrten die nach Abschluß der Vorperiode gemessenen Thromboplastinzeiten so schnell (36 - 48 Stunden) in die Nähe des Normbereichs zurück, daß kleine Unterschiede in der Vitamin K - Dosis nicht mehr in Differenzen der Thromboplastinzeit aufgefunden werden konnten. Im Testmodell erfolgt die Gabe von Vitamin K daher stets gleichzeitig mit einem Vitamin K - Antagonisten zur Erhöhung der Meßgenauigkeit.

Die Thromboplastinzeit-Bestimmung nach QUICK erwies sich der Methode nach HARTERT als überlegen, da bei QUICK-Wert-Senkungen unter 15 % (also in dem angestrebten Bereich) eine sichere Erfassung des Gerinnungseintritts mit der Methode nach HARTERT nicht mehr möglich ist.

Bei der Methode nach HARTERT werden mit Hilfe einer automatischen Mikropipette durch Federhub in Kunststoffkapillaren 0,02 ml Schnepferstichblut aufgezogen und in Reagenzgläser zu 0,04 ml Thromboplastin gegeben. Die Kunststoffkapillare wird dann etwa zweimal pro Sekunde bis zum Gerinnungseintritt durch das Gemisch gezogen.

Heterologes (Rinder-)Thromboplastin führte in Wiederholungsuntersuchungen zu uneinheitlicheren Werten als homologes Thromboplastin, was sich bei Thromboplastinzeiten über 100 sec als besonders nachteilig bemerkbar machte.

Aus statistischen Überlegungen wurde Thromboplastinzeit-Bestimmungen in Einzelplasmen der Vorrang gegenüber Mischplasmauntersuchungen gegeben. Thromboplastinzeit-Bestimmungen in unverdünntem Plasma erschienen in gleicher Weise aussagefähig, wie die Werte, die aus verdünntem Plasma (10, 25, 50 und 75 %) gewonnen wurden. Deshalb wurde die weniger arbeitsaufwendige Methode (unverdünntes Plasma) beibehalten.

Die zur Vitamin K - Depletion im Stadium der Voruntersuchungen herangezogenen Futtermischungen basierten alle auf Sojaprotein. Nachdem selbst mit halbsynthetischen Rationen (isoliertem Sojaprotein (methionin- und glycinerigänzt) und Maisstärke) keine günstigen Ergebnisse (kürzere Depletionsdauer oder weiterreichende Depletion) erzielt werden konnte als mit einer in Tab. 1 angegebenen einfach zusammengesetzten Futtermischung, wurde diese Sojaschrot- Mais-Maisstärke-Ration auch in den folgenden Versuchen eingesetzt.

In den Versuchen I und II sollte die Sensibilität des vorgeschlagenen Testmodells zur Bestimmung der Vitamin K - Versorgung untersucht werden. Gleichzeitig sollte die von der entsprechenden Vitamin K - Dosierungsreihe abhängige optimale Dosis des Vitamin K - Antagonisten Cumatetralyl geprüft werden. Besondere Bedeutung wurde der zuverlässigen Bestimmung eines niedrigen Vitamin K - Versorgungsstatus

zugemessen, weil die späterhin beabsichtigte Untersuchung von Alleinfutterproben (ca. 0,5 - 1 ppm Vitamin K erwartbar) ohne Störungen des Testmodells auch bei geringgradigem Verschnitten der Vitamin K - armen Basalration mit der zu untersuchenden Futterprobe möglich erscheint. Wenn dabei ein Zusatz von 5 - 10 % der Futterproben zur Basalration aus Gründen der Nährstoffversorgung des Versuchstiers noch toleriert werden kann, so resultiert daraus, daß in den Versuchsrationen 25 - 100 mcg Vitamin K / kg noch reproduzierbar gemessen werden müssen.

In Versuch III wurden zwei Menadionderivate hinsichtlich ihrer Vitamin K - Aktivität nach unterschiedlichen Futter-Lagerungs- und Herstellungsbedingungen miteinander verglichen.

Als Versuchskriterium diente die Thromboplastinzeit. Daneben wurden aber noch Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung sowie Mortalität erfaßt und zur Beurteilung der Versuchsergebnisse mit herangezogen.

1. Methodik

Vitamin K - depletierte männliche Broilerküken erhielten nach 25 - 33tägiger Depletion mit einer Vitamin K - armen Basalration dieselbe Futtermischung mit Vitamin K und Cumatetralyl in unterschiedlicher Dosierung supplementiert, zum ad libitum Verzehr angeboten.

Die Wirkung von Vitamin K und Cumatetralyl wurde anhand der Thromboplastinzeit gemessen.

Die 3 Versuche unterscheiden sich hinsichtlich der Dauer der Vor- und Versuchsperiode und der Wirkstoffdosierungsreihen.

Die allen Versuchen gemeinsamen Methoden sind in den folgenden Abschnitten 1.1. bis 1.6. zusammengefaßt.

Tab. 1

Vitamin K - arme Basalration

(Rohprotein: 21 %; umsetzbare Energie: ca. 3160 Kcal/kg)

Rationszusammensetzung	%
Sojaextraktionsschrot (48,5 % RP)	40,0
Mais	20,0
Maisstärke	33,1
Sojaöl	2,0
Dicalciumphosphat	2,5
Futterkalk, kohlsauer	0,5
Viehsalz	0,4
Vormischung I ¹⁾	1,0
Vormischung II ²⁾	0,5
	100,0

1) Vitamin-, Aminosäuren- und Spurenelementvormischung
auf Sojaschrot enthält in 10 g (= pro kg Basalration):

Vitamin A	5.000 i.E.
Vitamin D ₃	700 i.E.
Vitamin E	10 mg
Riboflavin	3 mg
Vitamin B ₁₂	10 mcg
Ca-Pantothenat	5 mg
Nikotinsäure	25 mg
Cholinchlorid	100 mg
DL-Methionin	2 g
Glykokoll	1,2 g

Spurenelemente als Sulfate:

Fe	50 mg
Zn	50 mg
Mn	60 mg
Cu	5 mg
J	76 mcg

2) Racumin [®] (Bayer) mit 0,75 % Cumatetralyl auf

Sojafeinmehl (jeweils wechselnde Anteile nach Versuchsplan)

1.1. Tiermaterial

Für alle Versuche wurden männliche Eintagsbroilerküken (LOHMANN B 975) aufgestellt. Sobald die Größe der Tiere eine routinemäßige Blutentnahme zuließ, wurden die Testrationen verabreicht.

Alle Tiere wurden während der Vorperiode individuell mit Flügelmarken gekennzeichnet.

1.2. Depletion

In der Vorperiode wurden die Küken mit der Vitamin K - armen Basalration (Tab. 1) vordepletiert. In der Regel war dieser Basalration noch 1 ppm Cumatetralyl zugesetzt (Ausnahme: Gruppe (10) - (12) in Versuch II), um eine weiterreichende Depletion - gemessen als verlängerte Thromboplastinzeit - zu erreichen.

1.3. Haltung der Versuchstiere

Alle Versuche wurden in einem ca. 40 qm großen Raum mit 48 Käfigeinheiten durchgeführt, der über einen Ölofen beheizt wurde. Die Käfige hatten einen großmaschigen Drahtboden und außen angebrachte Tränken und Futtertröge, um die Möglichkeit der Koprophagie zu verringern. Zusätzlich wurde auf gründliche Entfernung aller Kotreste in den Käfigen (ca. einmal täglich) geachtet.

Futter und Wasser standen zur freien Aufnahme zur Verfügung. Die Tiere erhielten in dem abgedunkelten Stall 24-Stunden-Dauerlicht und wurden in der Regel in wöchentlichen Abständen und am Ende der Vorperiode gewogen. Außerdem wurde der Futterverzehr in Versuch I rationsweise, in Versuch II und III käfigweise kontrolliert.

1.4. Herstellung der Rationen

Die Herstellung der Wirkstoffvormischungen erfolgte in einem 500 g-Mischgerät, die der Rationen der Versuchsperiode in einem 8000 g - Mischgerät, um eine möglichst homogene Verteilung der Wirksubstanzen zu erreichen.

Die einzelnen Rationen wurden so auf die Tiergruppen im Raum verteilt, daß eventuell auftretende Stalleinflüsse auf alle Versuchsgruppen gleichmäßig verteilt waren.

1.5. Vitamin K - Quelle

Als Vitamin K - Quelle diente in den Versuchen I und II MPB (Hetrazeen der Firma Heterochemicals). In Versuch III wurde MPB mit MSB verglichen.

1.6. Material und Methodik der Thromboplastinzeit-Bestimmung

1.6.1. Geräte

Die Gerinnungszeiten wurden, entsprechend der Körpertemperatur des Huhnes, bei 41 Grad Celsius gemessen. Dazu wurde ein Wasserbad, bestehend aus Glaswanne und Umlaufthermostat, verwendet. Ein an der Glaswanne befestigter Metallständer ließ die starkwandigen Reagenzgläser vom Kaliber 100 x 16 mm einige cm in das Wasser eintauchen. Der Gerinnungseintritt wurde mit einer glühbeständigen Platinersatzöse erfaßt, die Gerinnungszeit mit Hilfe einer Stoppuhr gemessen. Außerdem wurden benötigt: Zentrifuge, 2 ml Einwegspritzen, Kanülen Nr. 18, 0,1 ml Pipetten, Tuberkulinspritze, Bunsenbrenner und Reagenzglasgestelle.

1.6.2. Glaswarenreinigung

Die Reagenzgläser wurden nach Gebrauch mit kochendem Wasser gefüllt, danach von Blut- und Fibrinresten gereinigt und in heiße Pril-Lösung gelegt. Nach mehrfachem Spülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden sie über Nacht bei 105 Grad Celsius im Trockenschrank aufbewahrt.

Die Pipetten wurden nach Gebrauch kurz mit Wasser durchgespült und mindestens 12 Stunden in Chromschwefelsäure gelegt. Am nächsten Tag wurden sie mit Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. gereinigt und ebenfalls bei 105 Grad Celsius getrocknet.

1.6.3. Blutentnahme

Das Huhn wurde auf die linke Seite gelegt, die Ständer mit einer selbstsichernden Plastikschnur gefesselt. Der oben liegende Flügel wurde nach dorsal zurückgeschlagen und dort mit dem Daumen der linken Hand fixiert. Der kleine Finger der linken Hand stützte die V. cutanea ulnaris im Oberarmbereich. Darauf wurde die Vene in dem über dem Ellbogengelenk verlaufenden Teil punktiert. Dabei wurde die Kanüle etwas in die Vene eingeschoben.

Zur Entnahme wurden 2 ml Einwegspritzen, in die vorher 0,2 ml 3,8 %iges Natriumcitrat aufgezogen worden waren, und Kanülen Nr. 18 verwendet. Bei jeder Blutentnahme wurden genau 1,8 ml Blut entnommen, um mögliche Einflüsse unterschiedlicher Blutmengen bzw. unterschiedlicher Anteile von Gewebsthrombokinasen auf die Thromboplastinzeit weitgehend auszuschalten.

Ferner wurde durch Farbmarkierung sichergestellt, daß jedes Küken nur einmal zur Blutentnahme kam. Dadurch sollten Fehlerquellen durch individuelle Abnormitäten

im Gerinnungsstatus gering gehalten und eine mögliche Beeinflussung der Gruppen-Thromboplastinzeit durch eine falsche Stichprobenwahl vermieden werden.

1.6.4. Thrombokinasetherstellung

Von Blut- und Gewebsresten gesäuberte Eintagsküken-gehirne wurden mit einem Ultraturrax bei 24000 Upm homogenisiert. In einem Becherglas wurde das Homogenisat dreimal mit der dreifachen Menge säurefreien Acetons gewaschen und nach dem Abgießen des Überstandes 2 Stunden im Exsikkator getrocknet. Dem so entstandenen Pulver wurden pro g Substanz 25 ml phys. Kochsalz- und 0,5 ml 1,34 %ige Natriumoxalatlösung zugegeben. Die Aufschwemmung wurde dann 1/2 Stunde in einem Wasserbad bei 50 - 54 Grad Celsius gehalten. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 2000 Upm wurde der Überstand in Ampullen à 1 ml abgefüllt. Die Ampullen wurden anschließend verschmolzen und bei - 20 Grad Celsius aufbewahrt.

1.6.5. Thromboplastinzeit-Bestimmung nach QUICK

Blut und Citrat wurden nach der Blutentnahme in der Einwegspritze gut miteinander vermischt und ohne Schaumbildung in ein Reagenzglas gebracht. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 3000 Upm wurden 0,1 ml des Citratplasmas im Wasserbad bei 41 Grad Celsius vorgewärmt. Dann wurden je 0,1 ml Thromboplastin und m/40 Kalziumchloridlösung (ebenfalls auf 41 Grad Celsius vorgewärmt) in einer Tuberkulinspritze aufgezogen, gemischt und unter Vermeidung von Schaumbildung dem vorgelegten Plasma zugesetzt. Gleichzeitig wurde eine Stoppuhr in Gang gesetzt.

Darauf wurde 2 - 3 mal pro Sekunde eine ausgeglühte, erkaltete Platinersatzöse durch das Gemisch gezogen. Sobald der erste Fibrinfaden hängenblieb, wurde die

Uhr gestoppt. Die abgelesene Zeit entspricht der Thromboplastinzeit. Für jede Blutprobe wurde (mindestens) eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Wie schon von anderen Autoren erwähnt, erwies es sich auch hier als vorteilhaft, eine bestimmte Höchstgrenze für extrem lange bzw. nicht mehr meßbare Thromboplastinzeiten einzuführen. Dadurch können auch nicht geronnene Plasmaproben in die Berechnungen einbezogen werden.

In den hier vorgelegten Versuchen wurde als Höchstwert der Thromboplastinzeit 250 sec angesetzt.

2. Versuch I

2.1. Versuchsanlage

In Versuch I sollte anhand unterschiedlicher Cumatetralyl- und Vitamin K - Konzentrationen (zweifaktorielle Versuchsanstellung) ein Testbereich gefunden werden, in dem die Unterschiede in den Sekundenwerten der Thromboplastinzeiten in Abhängigkeit von verschiedenen Vitamin K - Dosierungen deutlich zu Tage treten. Weiter sollte der Vitamin K - Dosierungsbereich (in Abhängigkeit von der Cumatetralyl-Konzentration) ermittelt werden, der eine besonders enge, möglichst lineare Beziehung zwischen Vitamin K - Konzentration und Thromboplastinzeit erwarten läßt. Die Versuchsanlage ist in Tab. 2 wiedergegeben.

Als Cumatetralyl-Dosierungen wurden 5, 10, 15 bzw. 20 ppm gewählt. Es erschien zweckmäßig, die Dosierung von 20 ppm Cumatetralyl nicht zu überschreiten, da anderenfalls aufgrund der Erfahrungen aus den bereits erwähnten Voruntersuchungen mit einem starken Anstieg der Mortalitätsrate

gerechnet werden mußte. Pro Cumatetralyl-Dosierung wurde eine menadionfrei gefütterte Rationsgruppe mitgeführt, um Aufschluß über den zu erwartenden Anstieg der Thromboplastinzeiten bei Dosierungen unter 125 ppb Menadion zu bekommen. Außerdem sollte dabei geprüft werden, ob und inwieweit die zu erwartenden durchschnittlichen Thromboplastinzeiten von 150 und mehr Sekunden exakt meßbar sind. Menadion wurde als Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit ("Hetrazeen") in Dosierungen von 125 und 500 ppb (5 und 15 ppm Cumatetralyl), 125, 250 und 500 ppb (10 ppm Cumatetralyl) bzw. 125, 250, 500, 1000 und 2000 ppb (20 ppm Cumatetralyl) dem Futter zugesetzt. Die erweiterte Staffelung der Menadion-Dosierung in der Rationsgruppe mit 20 ppm Cumatetralyl diente der Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve. Die hohe Dosierung des Antikoagulans ließ die relativ höchsten Unterschiede zwischen den Thromboplastinzeiten der sechs verschiedenen Menadion-Dosierungsgruppen erwarten.

Tab. 2 - Versuchsanlage zu Versuch I

Tierzahl: 16 x 3 x 10 Broiler (B 975, ♂)

33 Tage Vorfütterung mit 1 mg Cumatetralyl/kg Futter

14 Tage Versuchsperiode

Cumatetralyl (mg/kg)	Menadion (mcg/kg)						
	(als Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit)						
5	0	125		500			
10	0	125	250	500			
15	0	125		500			
20	0	125	250	500	1000	2000	

2.2. Versuchsdurchführung

Bei Versuchsbeginn wurden 480 Eintagsküken in Gruppen von je 10 Tieren auf 48 Käfige verteilt. In 33 Tagen Vorfütterung (=Vorperiode) wurden alle Tiere mit der Cumatetralyl (1 ppm) - haltigen Basalration depletiert. In diesem Zeitraum betrug die Gesamtmortalität 8,5 %. Eine orientierende Untersuchung mit 48 Küken (1 Tier/Käfig) erbrachte eine mittlere Thromboplastinzeit von 36,8 sec. Die Einzelwiegung am 33. Tag ergab ein mittleres Gewicht aller Tiere von 640 g.

Unmittelbar nach der Wiegung wurde mit der Fütterung der Testrationen (an 3 x 7 - 10 Küken) begonnen. Der darauffolgende Tag wurde als 1. Tag der insgesamt 14tägigen Versuchsperiode betrachtet. Am 2. und jedem zweiten darauffolgenden Tag, also an insgesamt 7 Testtagen, wurde je einem Tier pro Käfig Blut entnommen.

Die weitere Versuchsdurchführung entsprach dem unter C., 1.1. - 1.6. beschriebenen Verfahren. Als Hauptversuchskriterium diente die Thromboplastinzeit. Zusätzlich wurde die Mortalität, die Gewichtsentwicklung und der Futterverzehr/Rationsgruppe registriert und die Futterverwertung errechnet.

2.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuch I sind in Tab. 3 und den Abb. 8, 9, 10, 11 und 12 zusammengefaßt.

2.3.1. Mortalität

In den Rationsgruppen ohne Menadionzusatz wird der Einfluß steigender Cumatetralyl-Dosierungen auf die Mortalitätsrate deutlich. Bei 5, 10, 15 bzw. 20 ppm Cumatetralyl wurden 3, 10, 40 bzw. 42 % Verluste registriert. In allen Cumatetralyl-Dosierungsgruppen

Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch I (Versuchsperiode)

Tierzahl pro Versuchsgruppe: 3 x 10 Broiler (B 975, ♂)

33 Tage Vorperiode (1 ppm Cumatetralyl) - 14 Tage Versuchsperiode

Code Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
ppm Cumate- tralyl	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	20	20	20	20	20	20
ppb Menadion	0	125	500	0	125	250	500	0	125	500	0	125	250	500	1000	2000
Mortalität (%)	3	0	0	10	7	0	0	40	3	10	42	4	3	4	3	3
Zunahme (g / Tier)	483	574	575	438	529	603	531	332	424	540	252	432	472	563	532	597
Futterver- zehr/Tier u. Tag (g)	80	86	90	76	88	90	81	73	76	82	63	83	79	87	85	90
g Futter / g Zunahme	2,50	2,27	2,34	2,62	2,59	2,25	2,32	3,42	2,69	2,42	4,23	2,92	2,60	2,38	2,42	2,24
Thrombo- plastin- zeit (sec)	66,1	41,7	26,3	105,3	59,5	51,4	45,7	134,4	70,2	53,6	174,0	102,3	78,7	59,6	55,8	46,8

genügten 125 ppb Menadion, um die Verlustrate auf einem etwa gleichen Niveau (0, 7, 3 bzw. 4 % für 5, 10, 15 bzw. 20 ppm Cumatetralyl) zu halten. Besonders in den Gruppen mit 15 bzw. 20 ppm Cumatetralyl konnte auch durch höhere Menadion-Gaben die Mortalitätsrate nicht weiter reduziert werden.

2.3.2. Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Küken wurde im Bereich ausgeprägten, absoluten und relativen Vitamin K - Mangels (Rationsgruppen (1), (4), (8), (9), (11), (12) und (13)) deutlich negativ beeinflusst. Sie wird bereits durch Menadion-Konzentrationen von 125 ppb in den Gruppen mit 5 und 10 ppm Cumatetralyl weitgehend normalisiert (Abb. 8). Eine varianzanalytische Prüfung der Ergebnisse der drei allen Cumatetralyl-Gruppen gemeinsamen Menadiondosierungen (0, 125, 500) führte zu folgenden Ergebnissen (siehe auch Tab. 4.): 125 mcg Menadion/kg Futter bewirkten in allen Cumatetralyl-Dosierungen eine signifikante ($P < 0,05$) Mehrzunahme gegenüber den menadionfrei ernährten Tieren. 500 mcg Menadion/kg Futter führten dagegen nur in den 15 und 20 ppm Cumatetralyl-Gruppen zu signifikanten ($P < 0,01$) Mehrzunahmen.

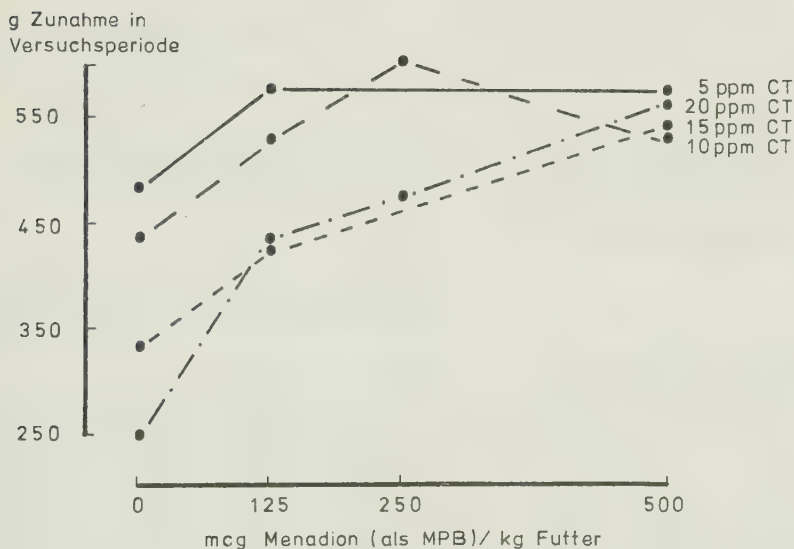
Weniger gut lassen sich die Folgen steigender Cumatetralyl-Dosierung statistisch absichern. Signifikante ($P < 0,05$) Unterschiede in den Wachstumsraten entstanden nur durch die Erhöhung der Cumatetralyl-Dosis von 5 auf 10, 15 und 20 bzw. von 10 auf 15 und 20 ppm. Die Gruppen mit 15 und 20 ppm Cumatetralyl unterschieden sich nicht mehr in ihrer mittleren Wachstumsrate ($P > 0,05$).

Abb. 8 -

Gewichtszunahmen von Cumatetralyl-belasteten Broilern (σ^7)
unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung

33 Tage Vorfütterung (1 ppm Cumatetralyl)

14 Tage Versuchsperiode (5, 10, 15 sowie 20 ppm Cumatetralyl)



Tab. 4

Gewichtszunahme (g) pro Tier ¹⁾ während der Versuchsperiode
(34. - 47. Lebenstag)

Cumatetralyl (ppm)	Menadion (ppb)			Ø ³⁾
	0	125	500	
5	483	574	575	544
10	438	529	531	499
15	332	424	540	432
20	252	432	563	416
Ø ²⁾	376	490	552	

1) Grenzdifferenz $P < 0,05$: 76 g für alle 12 Versuchsgruppen

2) Grenzdifferenzen:

$P < 0,05$	=	38 g
$P < 0,01$	=	51 g
$P < 0,001$	=	69 g

3) Grenzdifferenzen:

$P < 0,05$	=	44 g
$P < 0,01$	=	59 g
$P < 0,001$	=	79 g

Diese Ergebnisse deuten an, daß bereits die Gewichtsentwicklung in einem Bereich starken Vitamin K - Mangels Rückschlüsse über den relativen Vitamin K - Versorgungsstatus einer Ration zuläßt.

2.3.3. Futtermverzebr und Futtermverwertung

Futtermverzebr und Futtermverwertung zeigten bei Versuchsende deutliche rationsabhängige Unterschiede. Mit steigendem Menadiongehalt nahm der Verzebr / Tier u. Tag in nahezu allen (Cumatetrallyl) Gruppierungen zu. Steigende Cumatetrallyl-Dosierungen führten dagegen nur in den menadionfreien Rationsgruppen zu einer kontinuierlichen Abnahme des Verzehrs (siehe Tab. 5.). Diese Tendenzen manifestierten sich auch bei den Futtermverwertungsdaten. Ein gewisser Unterschied lag allerdings darin, daß auch bei den Rationen mit 125 mcg Menadion/kg Futter steigende Cumatetrallyl-Dosierungen eine stetig ungünstiger werdende Futtermverwertung zur Folge hatten.

Für beide Kriterien gilt demnach wie auch für Mortalität und Gewichtsentwicklung, daß in einem Bereich von 0 bis 125 mcg Menadion je kg Vitamin K - arme Basalration die deutlichsten Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu erwarten sind.

Tab. 5

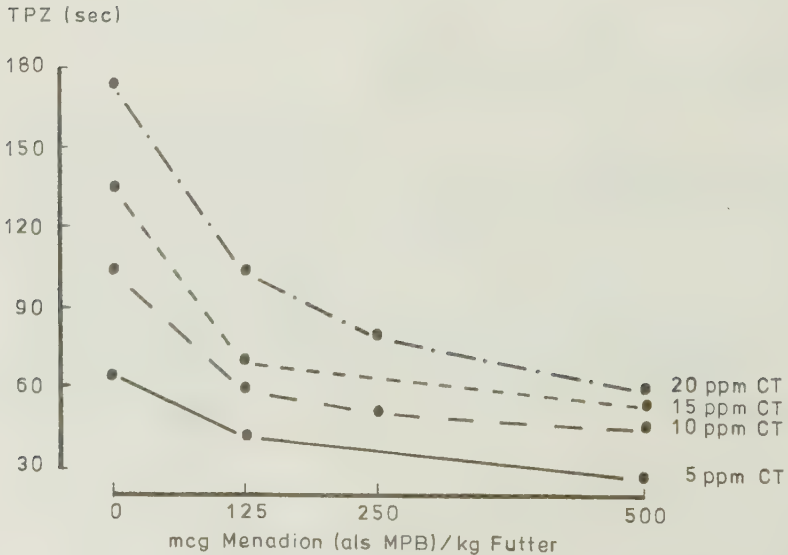
Futtermverzebr und Futtermverwertung

Cumatetrallyl (ppm)	g Verzebr / Tier u. Tag			Futtermverwertung (g Futter / g Zunahme)		
	Menadion (ppb)			Menadion (ppb)		
	0	125	500	0	125	500
5	80	86	90	2,50	2,27	2,34
10	76	88	81	2,62	2,59	2,32
15	73	76	82	3,42	2,69	2,42
20	63	83	87	4,23	2,92	2,38

2.3.4. Thromboplastinzeit

Durch die Zufütterung von Menadion war bei allen verwendeten Cumatetralyl-Dosierungen ein deutlicher Abfall der Thromboplastinzeit zu verzeichnen (Tab. 6). Die Thromboplastinzeit-Unterschiede waren jeweils am größten zwischen den Rationsgruppen ohne und denen mit 125 ppb Menadionzusatz, was mit den Ergebnissen der (unter Punkt 2.3.1. - 2.3.3.) bereits besprochenen Versuchs-kriterien gut übereinstimmt. Außerdem nahm die Thrombo-plastinzeit bei gleichbleibender Menadionstaffelung (0, 125 und 500 ppb) umso stärker zu, je mehr Cumatetralyl die Ration enthielt (Abb. 9).

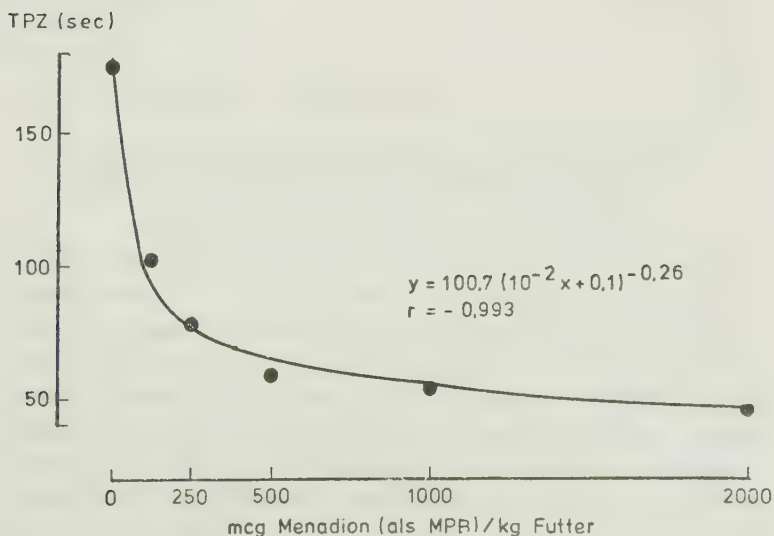
Abb. 9 - Thromboplastinzeiten von Cumatetralyl-belasteten
Broilern (♂) unter Einfluß steigender Menadion-
Dosierung
33 Tage Vorperiode - 14 Tage Versuchsperiode



Die Ergänzung der Basalration mit 125 mcg Menadion / kg Futter führte in allen Cumatetralyl-Gruppen zu einem signifikanten ($P < 0,05$ bei 5 ppm Cumatetralyl, $P < 0,001$ bei 10, 15 und 20 ppm Cumatetralyl) Abfall der Thromboplastinzeiten. 500 ppb Menadion gegenüber 125 ppb Menadion senkten die Thromboplastinzeit nur bei 20 ppm Cumatetralyl signifikant ($P < 0,05$), nicht dagegen in den übrigen Dosierungen ($P > 0,05$).

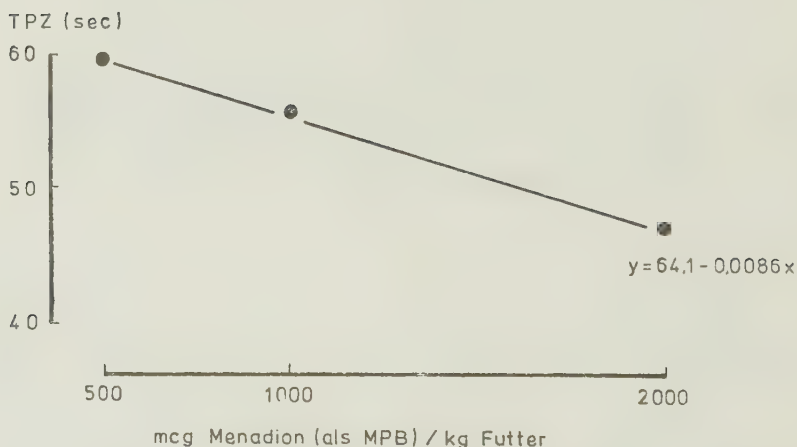
Die Beziehung zwischen Menadiondosierung und Thromboplastinzeit läßt sich besonders deutlich am Beispiel der hoch dosierten (20 ppm) Cumatetralyl-Gruppe in einem weiten Bereich von 0 - 2000 ppb Menadionzusatz darstellen (Abb. 10). Die eingezeichnete Beziehung entspricht der Funktion $y = 100,7(10^{-2}x + 0,1)^{-0,26}$. Thromboplastinzeit und Menadionzusatz sind mit $r = -0,993$ ($P < 0,001$) korreliert.

Abb. 10 - Thromboplastinzeiten von Cumatetralyl-belasteten Broilern (σ^7) unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung - (20 ppm Cumatetralyl-Gruppen)
33 Tage Vorperiode - 14 Tage Versuchsperiode



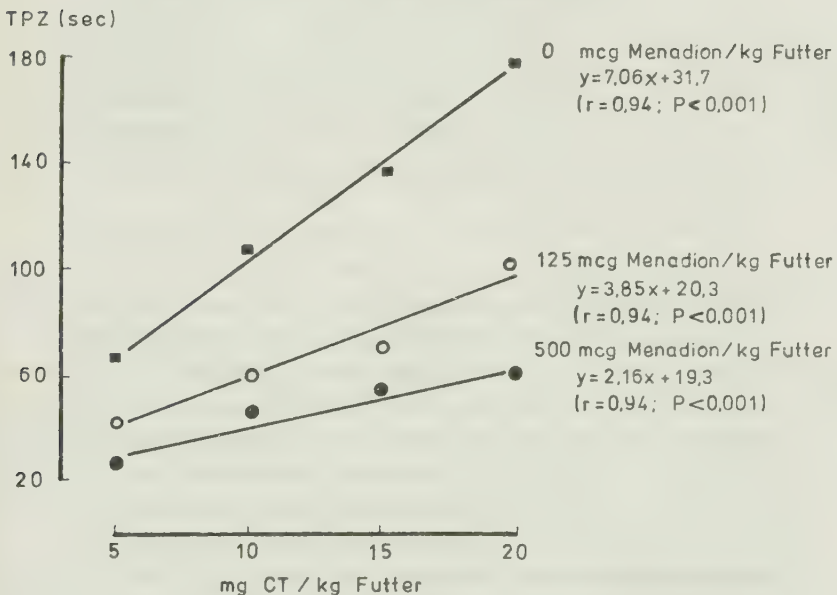
Im Bereich von 500 bis 2000 mcg Menadion / kg Futter sinkt die Thromboplastinzeit nahezu linear (Abb. 11). Die entsprechende Regressionsgleichung lautet:
 $y = 64,1 - 0,0086 x$; (Korrelationskoeffizient zwischen Thromboplastinzeit und Menadiongehalt: $r = - 0,73$, $P < 0,05$).

Abb. 11 - Thromboplastinzeiten von Cumatetralyl-belasteten
Broilern (♂) unter Einfluß steigender Menadion -
Dosierung (500, 1000 u. 2000 ppb Menadion)
33 Tage Vorperiode - 14 Tage Versuchsperiode
(20 ppm Cumatetralyl-Gruppen)



Betrachtet man die Thromboplastinzeiten unter dem Aspekt steigender Cumatetralyl-Dosierungen (Abb. 12), so erscheinen folgende Ergebnisse bemerkenswert: Die Thromboplastinzeiten steigen bei gleichbleibendem Menadiongehalt mit zunehmender Cumatetralyl-Dosis linear an (Positive Korrelation).

Abb. 12 - Thromboplastinzeiten von Broilern (σ^7) unter Einfluß steigender Cumatetralyl-Dosierung (bei 0, 125 bzw. 500 ppb Menadion)



Signifikant ($P<0,01$) unterschieden sich die Thromboplastinzeiten in allen Cumatetralyl-Dosierungen der menadionfreien Basalration (siehe auch Tab. 6.). Ebenfalls signifikant ($P<0,05$) waren die Thromboplastinzeiten erhöht durch die Verdoppelung der Cumatetralyl-Dosis von 5 auf 10 ppm in den 125 ppb und 500 ppb Menadiongruppen. 20 ppm Cumatetralyl verlängerten die Thromboplastinzeiten gegenüber den 10 ppm Cumatetralyl-Rationen

in der 125 ppb Menadiongruppe signifikant ($P < 0,001$),
nicht dagegen in der 500 ppb Menadiongruppe ($P > 0,05$).

Tab. 6

Thromboplastinzeiten ¹⁾ (sec) ausgewählter Versuchs-
gruppen.

Cumatetralyl (ppm)	Menadion (ppb)			Ø ³⁾
	0	125	500	
5	66,1	41,7	26,3	44,7
10	105,3	59,5	45,7	70,2
15	134,4	70,2	53,6	86,1
20	174,0	102,3	59,6	111,9
Ø ²⁾	120,0	68,4	46,3	

1) Grenzdifferenzen: $P < 0,05$ = 16,9 sec
 $P < 0,01$ = 22,8 sec
 $P < 0,001$ = 30,1 sec

2) Grenzdifferenzen: $P < 0,05$ = 9,3 sec
 $P < 0,01$ = 12,6 sec
 $P < 0,001$ = 16,9 sec

3) Grenzdifferenzen: $P < 0,05$ = 10,7 sec
 $P < 0,01$ = 14,5 sec
 $P < 0,001$ = 19,5 sec

Weiterhin zeigte sich, daß bei einer Verdoppelung der Cumatetralyl-Dosierung mindestens die 4fache Menadionmenge erforderlich ist, um annähernd gleiche Thromboplastinzeiten zu erreichen.

Tab. 7

Quantitatives Verhältnis von Cumatetralyl und Menadion
im Futter bei gleicher Thromboplastinzeit

Cumatetralyl (ppm)	5	10	20	10	20	10	20
Menadion (ppb)	125	500	2000	125	500	250	1000
Thromboplastin- zeit (sec)	41,7	45,5	46,8	59,5	59,6	51,4	55,8

Ein Vergleich der Gewichtsentwicklung (Zunahme in der Versuchsperiode) mit den Thromboplastinzeiten ergab folgende Zusammenhänge: Innerhalb der 4 Cumatetralyl-Gruppen waren Thromboplastinzeit und Gewichtsentwicklung in starkem Maße negativ korreliert ($r = -0,86$ für die 5 ppm Cumatetralyl-Gruppe, $P < 0,01$, $r = -0,76$ für die 10 ppm Cumatetralyl-Gruppe, $P < 0,01$, $r = -0,68$ für die 15 ppm Cumatetralyl-Gruppe, $P < 0,05$ und $r = -0,94$ für die 20 ppm Cumatetralyl-Gruppe, $P < 0,001$). Daraus geht hervor, daß bei zunehmender Prothrombinbildung auch die Syntheseleistung für Gewebeprotein (= Wachstumsrate) angehoben war.

3. Versuch II

In Versuch I konnten signifikante Beziehungen zwischen Menadiongehalt des Futters und den Thromboplastinzeiten aufgezeigt werden. Diese Korrelationen verliefen in den meisten Fällen nicht linear. Bezüglich der später geplanten Untersuchung von Futterproben mit unbekannter Vitamin K - Aktivität wäre Linearität aber von Vorteil erschienen. Die deutlichsten Unterschiede in der Thromboplastinzeit waren jeweils zwischen 0 und 125 ppb Menadion im Futter aufgetreten. Deshalb sollte dieser Vitamin K - Dosierungsbereich näher untersucht werden.

Von den in Versuch I geprüften 4 Cumatetralyl-Konzentrationen wurden 2 ausgeschieden: 5 ppm Cumatetralyl wegen zu geringer Sensitivitätserhöhung und 20 ppm Cumatetralyl wegen zu hoher Mortalität.

3.1. Versuchsanlage

Über die Versuchsanlage von Versuch II unterrichtet die Tab. 8.

5 Rationsgruppen sollten in der Vorperiode Futter mit 1 ppm Cumatetralyl erhalten. Anschließend wurden 5 Rationen mit 0, 30, 60, 90 bzw. 120 ppb Menadion bei gleichem Cumatetralyl-Gehalt (15 ppm) angeboten.

Diese 5 Versuchsgruppen sollten Aufschluß geben, ob

- 1.) bei den geringen Unterschieden (30 ppb) im Menadion-Gehalt noch reproduzierbare Unterschiede in der Thromboplastinzeit auftreten,
- 2.) eine lineare Dosis - Wirkungsbeziehung besteht und damit,
ob
- 3.) diese Dosierungsreihe als Standardkurve zur Bestimmung einer Ration (6) mit unbekanntem Menadiongehalt herangezogen werden kann.

Daneben wurde eine Menadionreihe (0, 60, 120 ppb), die in ihren Menadion-Konzentrationen der o.g. Versuchsreihe direkt vergleichbar war, eingerichtet, die in der Vorperiode Cumatetralyl-freies (Vitamin K-armes) Basalfutter erhalten hatte. Damit sollte geprüft werden, ob die Verwendung von 1 ppm Cumatetralyl in der Vorperiode tatsächlich die Sensibilität des Parameters Thromboplastinzeit erhöht. Anderenfalls könnte auf diese Maßnahme verzichtet werden, wodurch möglicherweise sich der insgesamt notwendige Tierstapel wegen geringerer Mortalität in der Vorperiode verringern ließe. Zum anderen durfte angenommen werden, daß infolge des Fortfalls des Vitamin K - Antagonisten Cumatetralyl die Gewichtsdepression der Vorperiode weniger stark ausgeprägt werde, so daß die Vorperiode evtl. verkürzt werden könne.

Im Vergleich zu den beiden genannten Menadion - Cumatetralyl - Dosierungsreihen wurde eine 3. Gruppierung eingeführt. Hier war die Cumatetralyl-Konzentration auf 10 ppm verringert (Vorperiode 1 ppm Cumatetralyl), der Menadion-Gehalt war auf 0, 50 bzw. 100 ppb festgelegt. Falls sich auch hier eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung einstellen sollte, würde der Anstieg der Regressionsgeraden (b) im Vergleich zu 0, 60 bzw. 120 ppb Menadion bei 15 ppm Cumatetralyl über die weitere Verwendung dieser Dosierungsreihe entscheiden.

Innerhalb der erstgenannten Dosierungsreihe sollte auch der Vitamin K - Gehalt einer Futterprobe untersucht werden, welche dem Experimentator unbekannt war. Es durfte angenommen werden, daß die Probe maximal 2,4 ppm Menadion enthielt. Bei Verschneiden von 50 g dieser Probe mit 950 g der (15 ppm Cumatetralyl enthaltenden) Vitamin K - armen Basalration entsteht eine Versuchsdiät mit max. 120 ppb Menadion, die als solche angeboten wurde (Ration x_T in Tab. 8.).

Tab. 8

Versuchsanlage zu Versuch II

Tierzahl: 48 x 8 Küken (♂, B 975), 4 x 8 / Ration

Dauer der Vorperiode: 25 Tage

Versuchsdauer: 13 Tage

Cumatetralyl (ppm)		mcg Menadion ¹⁾ / kg Futter							
Vorperiode Versuch									
1	15	0	30	-	60	90	-	120	x _T ²⁾
1	10	0	-	50	-	-	100	-	
0	15	0	-	-	60	-	-	120	

1) als Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit

2) Ration enthielt 5 % einer Futterprobe mit unbekanntem Menadion-Gehalt (max.: 2,4 ppm)

3.2. Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Zu Beginn der 25tägigen Vorperiode wurden je 8 Broiler ♂ (insgesamt 384 Küken) in insgesamt 48 Käfige eingesetzt. Zum Ausgleich evtl. auftretender Verluste wurden entsprechend vorgefütterte Ersatztiere mitgeführt.

Unmittelbar nach der Einzelwiegung am 25. Tag wurden jeweils 4 x 8 Broiler auf die verschiedenen Versuchsrationen gesetzt. Der 26. Tag nach Aufstallung galt analog zu Versuch I als 1. Versuchstag der 13tägigen Versuchsperiode (Gesamtversuchsdauer 38 Tage). Am 3. sowie jedem 2. darauffolgenden Tag, also an insgesamt 6 Testtagen, wurde je einem Tier aus jedem der 48 Käfige Blut (zur

Thromboplastinzeit-Bestimmung) entnommen, so daß pro Ration und Testtag 4 Küken untersucht wurden. Lediglich am 7. Tag der Versuchsperiode (= 3. Testtag) wurden nur 36 Tiere ausgewählt, was 3 Wiederholungen (Käfigen) pro Ration entsprach. Die Zahl der Einzel-Thromboplastinzeit-Bestimmungen pro Treatment lag mit 23 geringfügig höher als bei Versuch I.

Die Broiler wurden am 6. und 13. Tag der Versuchsperiode einzeln gewogen. Die weitere Versuchsdurchführung entsprach dem unter C., 1.1.-1.6. beschriebenen Verfahren. Als Kriterien dienten, wie bei Versuch I, Thromboplastinzeit, Mortalität, Gewichtsentwicklung und Futterverzehr. Letzterer wurde käfigweise kontrolliert. Aus Gewichtsentwicklung und Futterverzehr ergaben sich die Daten der Futterverwertung.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Vorperiode

Die Mortalität der Tiere mit Cumatetralyl-haltigem Futter lag mit 3,8 % geringfügig höher als die der Gruppe ohne Cumatetralyl-Zufütterung (3,1 %).

Die Cumatetralyl-frei gefütterten Broiler waren im Durchschnitt mit 511 g signifikant ($P < 0,001$) schwerer als die mit 1 ppm Cumatetralyl in der Basalration versorgten Tiere (485 g).

Am letzten Tag der Vorperiode wurde in einem "Vortest" die Thromboplastinzeit von je einem Küken pro Käfig gemessen. Die mittleren Thromboplastinzeiten wurden mit 30,4 sec für die Küken mit Cumatetralyl-Vor-fütterung bzw. mit 22,7 sec für die Cumatetralyl-frei

ernährten Küken bestimmt ($P < 0,01$).

3.3.2. Versuchsperiode

Eine Übersicht über die Ergebnisse von Versuch II enthält Tab. 9.

3.3.2.1. Mortalität

Steigende Menadiondosierung brachte in allen Fällen einen Rückgang der Mortalität, wobei ähnlich wie in Versuch I bereits mit 120 ppb Menadion (15 ppm Cumatetralyl) bzw. 100 ppb Menadion (10 ppm Cumatetralyl) fast keine Verluste mehr zu verzeichnen waren (1 Tier von 96). Der Einfluß ($P > 0,05$) von 1 ppm Cumatetralyl in der Vorfütterung deutet sich an in einer Verlustrate von 19,8 % für die Rationen mit 0, 60 und 120 ppb Menadion gegenüber 15,6 % für die Rationen mit gleichem Menadion-Gehalt ohne Cumatetralyl-Vorfütterung.

3.3.2.2. Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Broilerküken während der 13tägigen Versuchsperiode war, wie aus Tab. 9 und Abb. 13 ersichtlich, mit steigender Menadion-Zufütterung positiv korreliert ($r = 0,57$, $P < 0,001$). Ein gewisser Einfluß der unterschiedlichen Cumatetralyl-Vorfütterung sogar auf die Gewichtsentwicklung in der Versuchsperiode zeichnet sich beim Vergleich der mittleren Zunahmen der Rationen (10), (11), (12) mit derjenigen der Rationen (1), (3), (5) ab. Im Durchschnitt belief sich die Zunahme der Küken ohne Cumatetralyl-Vorfütterung auf 323 g, die der Küken mit 1 ppm Cumatetralyl-Vorfütterung auf 306 g ($P > 0,05$). Zu berücksichtigen ist, daß die Küken der Rationen (10), (11), (12) im Vergleich zu den Küken der Rationen (1), (3), (5) eine höhere Menadion-Zufütterung erhielten.

Tab. 9

Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch II (Versuchsperiode)

Tierzahl pro Versuchsgruppe: 4 x 8 Broiler (B 975, ♂)

25 Tage Vorperiode - 13 Tage Versuchsperiode

Code Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
ppm Cumatetralyl Vorperiode	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
ppm Cumatetralyl Versuchsperiode	15	15	15	15	15	15	10	10	10	15	15	15
ppb Menadion	0	30	60	90	120	x _T ¹⁾	0	50	100	0	60	120
Mortalität (%)	47	38	10	7	3	25	19	10	0	35	10	0
Körpergewicht Ende Vorperiode (g)	492	472	479	499	492	481	488	495	473	507	512	514
Gewichtszunahme in Versuchsperiode (g) 2)	256	243	276	315	385	342	311	380	378	275	309	386
Verzehr/Tier u.Tag (g)	53	48	56	60	63	57	54	61	60	54	58	66
g Futter / g Zunahme 3)	3,32	2,83	2,61	2,53	2,14	2,33	2,35	2,13	2,06	2,70	2,48	2,22
Thromboplastinzeit(sec) 4)	162,6	144,7	114,0	96,2	79,4	117,1	121,6	88,6	71,6	151,5	121,0	75,7

1) Ration enthielt 5 % einer Futterprobe mit unbekanntem Menadion-Gehalt (max.: 2,4 ppm)

2) Grenzdifferenzen: $P < 0,05 = 69$ g; $P < 0,01 = 92$ g; $P < 0,001 = 122$ g

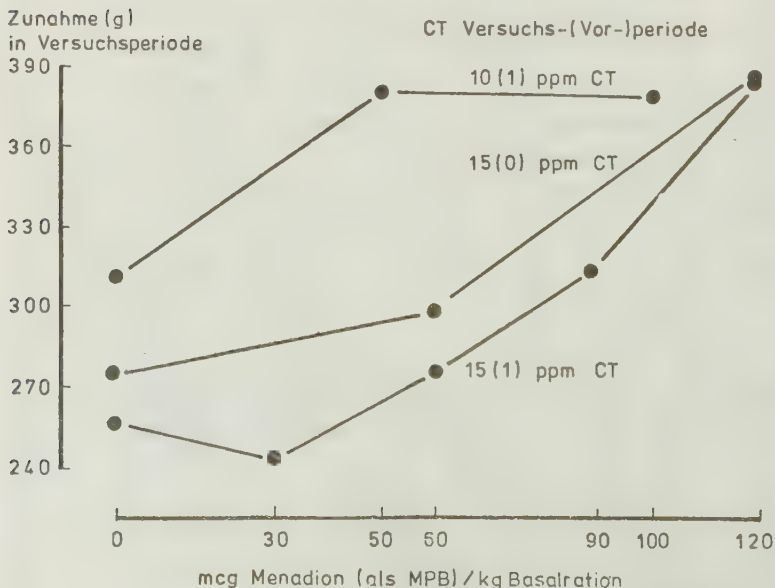
3) Grenzdifferenzen: $P < 0,05 = 0,37$)
 $P < 0,01 = 0,50$) g Futter / g Zunahme
 $P < 0,001 = 0,66$)

4) Grenzdifferenzen: $P < 0,05 = 28,7$ sec; $P < 0,01 = 34,2$ sec; $P < 0,001 = 45,0$ sec

sichtigenwäre dabei allerdings das höhere mittlere Ausgangsgewicht von 511 g im Mittel der Rationsgruppen (10), (11) und (12) zu Beginn der Versuchsperiode. Mit 356 g liegen die mittleren Zunahmen in der 10 ppm Cumatetralyl-Gruppierung (Rationen (7), (8) und (9)) trotz des geringsten Ausgangsgewichts (485 g) noch deutlich über denen der beiden übrigen Gruppierungen.

Eine statistische Überprüfung mittels Varianzanalyse ergab relativ hohe Grenzdifferenzen. Die Ursache dafür lag an den teilweise hohen Streuungen zwischen den Wiederholungen einiger Rationen. Dementsprechend unterschieden sich die Zunahmen nur weniger Rationsgruppen signifikant voneinander (z.B. 0 ppb Menadion (1) von 120 ppb Menadion (5) mit $P < 0,001$; 0 ppb Menadion (10) von 120 ppb Menadion (12) mit $P < 0,01$).

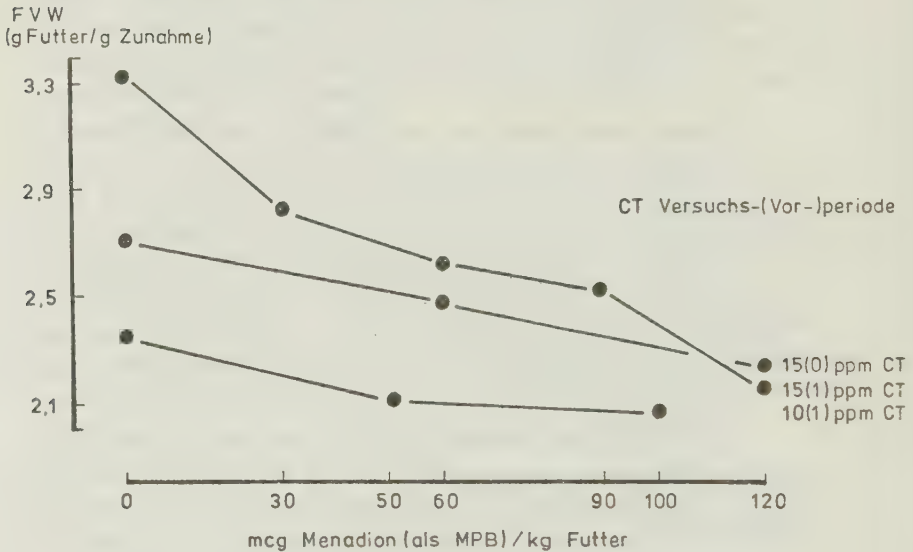
Abb. 13 - Gewichtszunahmen von Cumatetralyl-belasteten Broilern (σ^7) unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung
Tierzahl/Versuchsgruppe: 4 x 8
25 Tage Vorperiode - 13 Tage Versuchsperiode



3.3.2.3. Futtermittelverzehr und Futtermittelverwertung

Auch die Futterrohverwertung in der Versuchsperiode stand in deutlicher Beziehung zum Menadion-Angebot. Steigender Menadiongehalt in der Basalration führte zu erhöhtem Futtermittelverzehr der Tiere (siehe Tab. 9). In Abhängigkeit von steigender Menadiondosierung war, bedingt durch deutlich erhöhte Zunahmen der Tiere, eine verbesserte Futtermittelverwertung zu verzeichnen (Abb. 14). Die günstigste Futtermittelverwertung wiesen die Tiere der 10 ppm Cumatetralyl-Gruppierung mit durchschnittlich 2,19 g Futter/g Zunahme auf. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Rationen (1), (3), (5) (Vorfütterung 1 ppm Cumatetralyl) mit den Rationen (10), (11), (12) (ohne Cumatetralyl in der Vorperiode), so zeigt sich der Einfluß der unterschiedlichen Behandlung in der Vorperiode auf die Futtermittelverwertung in der Versuchsperiode. Die Küken ohne Cumatetralyl in der Basalration der Vorperiode hatten mit durchschnittlich 2,47 g Futter je g Zunahme eine bessere Futtermittelverwertung als die Küken der entsprechenden Rationen (1), (3), (5) mit 2,69 g Futter/g Zunahme ($P > 0,05$).

Abb. 14 - Futterverwertung von Cumatetralyl-belasteten Broilern
(♂) unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung
Tierzahl/Versuchsgruppe: 4 x 8
25 Tage Vorperiode - 13 Tage Versuchsperiode



3.3.2.4. Thromboplastinzeit

3.3.2.4.1. Thromboplastinzeit in Abhängigkeit zur Menadiondosierung

Eine Erhöhung des Menadiongehalts in den Rationen führte zu linearem Abfall der Thromboplastinzeiten in den 3 verschiedenen Gruppierungen (1) - (5), (7) - (9) bzw. (10) - (12). Zur Verdeutlichung der Linearität wurden folgende Gleichungen aufgestellt (siehe auch Tab. 9 und Abb. 15 u. 16.).

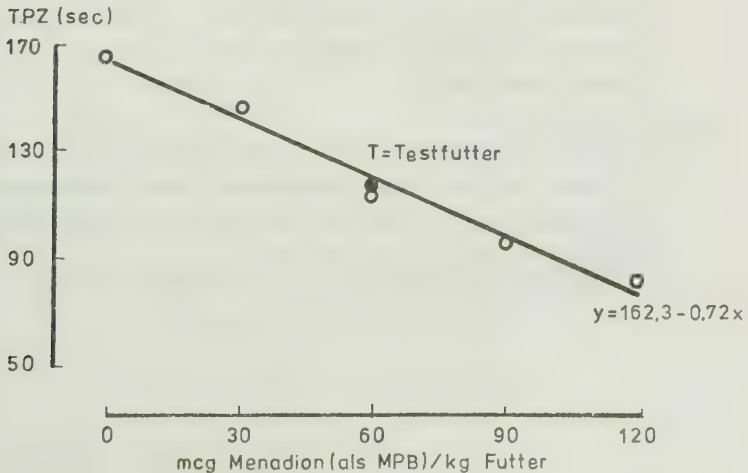
Rationen (1) - (5) = 0, 30, 60, 90 und 120 ppb
Menadion bei 15 ppm Cumatetralyl:
 $y = 162,3 - 0,72 x$; $r = - 0,88$, $P < 0,001$.

Die geringen Abweichungen zwischen den rechnerisch ermittelten Werten (Geradenpunkte) und den tatsächlich gemessenen Thromboplastinzeiten bestätigen die exakte Bestimmbarkeit derart geringer Menadion-Dosierungen.

In der Testrationsgruppe (x_T) wurde eine Thromboplastinzeit von 117,1 sec ermittelt. Der benachbarte Wert wurde mit 114,0 sec in Gruppe (3), 60 ppb Menadion-zusatz gefunden. Dies weist bereits darauf hin, daß der Menadion-Gehalt der Testration in der Größenordnung von 60 ppb (= 1,2 ppm in der Futterprobe) sich bewegen dürfte.

Mittels einer grafischen Auswertung (Abb. 15) wurde der Menadion-Gehalt der Testration mit 63 ppb bestimmt, was einer Menadion-Konzentration in der Futterprobe (die mit 5 % in der Testration enthalten war) von 1,26 ppm entspricht.

Abb. 15 - Thromboplastinzeiten von Cumatetralyl-belasteten Broilern (○) unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung
25 Tage Vorfütterung (1 ppm Cumatetralyl) - 13 Versuchstage (15 ppm Cumatetralyl)
23 Tiere im Mittel/Kurvenpunkt



Tatsächlich waren der Futterprobe, wie sich später nach Öffnung der versiegelten Mischunterlage ergab, 1,20 ppm Menadion als MPB eingemischt worden.

Damit scheint die Auffindung auch geringster Vitamin K - Aktivitäten im Alleinfutter nach dem hier vorgeschlagenen Untersuchungsmodell möglich zu sein. Zukünftige Experimente sollten diesen Einzelbefund an einer Vielzahl von Proben zu untermauern versuchen.

Für die Gruppen (7), (8) und (9) (1 ppm Cumatetralyl in der Vorperiode, 10 ppm Cumatetralyl in der Versuchsperiode, 0, 50 bzw. 100 ppb Menadion) ergab sich aus den gemessenen Thromboplastinzeiten eine Regressionsgerade mit der Gleichung:
 $y = 118,9 - 0,5 x; \quad r = - 0,87, \quad P < 0,001$ (Abb. 16).

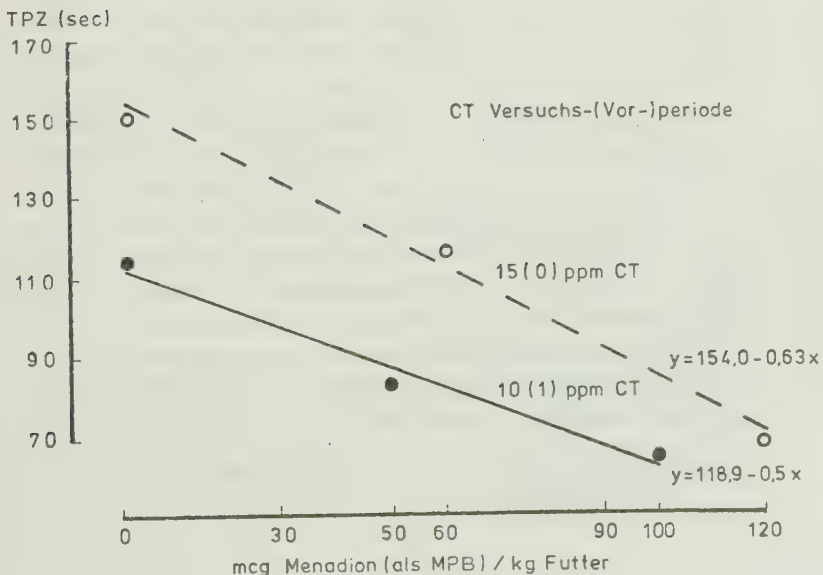
Die Meßwerte wichen auch hier nur geringfügig von den entsprechenden Rechenwerten der Geraden ab. Die Steigung der Regressionsgeraden ($b = - 0,50$), die als wichtiges Kriterium für die reproduzierbare Meßbarkeit der Thromboplastinzeit in einem derart niedrigen Menadion-Dosisbereich gilt, war verglichen mit der Steigung der genannten Regressionsgeraden (Abb. 15; 0, 30, 60, 90 und 120 ppm Menadion bei 15 ppm Cumatetralyl) ($b = - 0,72$) stark verringert.

Für die Gruppe mit 0, 60 und 120 ppb Menadion bei 15 ppm Cumatetralyl (Vorperiode ohne Cumatetralyl) ergaben sich folgende Beziehungen zwischen Menadion-Gehalt und Thromboplastinzeit:
 $y = 154,0 - 0,63 x; \quad r = - 0,84, \quad P < 0,001$ (Abb. 16).

Bezüglich Steigung ($b = -0,63$) der Regressionsgeraden und der gemessenen Thromboplastinzeiten nimmt diese Gruppierung gegenüber den beiden übrigen Gruppierungen eine Zwischenstellung ein, was sich bereits bei den Versuchskriterien Mortalität, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung gezeigt hatte.

Ein Vergleich der beiden Gruppierungen mit gleicher Cumateträlyl-Behandlung in der Versuchsperiode (15 ppm) ergab, daß nach Cumateträlyl-Belastung in der Vorperiode (1 ppm) eine geringfügig größere Steigung der Regressionsgeraden Menadion-Dosierung : Thromboplastinzeit ($b = -0,72$) auftrat als bei antikoagulantien-freier Vorperiode ($b = -0,63$).

Abb. 16 - Thromboplastinzeiten von Cumateträlyl-belasteten Broilern (σ^7) unter Einfluß steigender Menadion-Dosierung
25 Tage Vorperiode - 13 Tage Versuchsperiode
im Mittel/Kurvenpunkt: 23 Tiere



In Tab. 10 sind für die Rationsgruppen (1), (3) und (5), (7), (8) und (9) sowie (10), (11) und (12) die Variationskoeffizienten der Thromboplastinzeit getrennt nach Streuungsursache innerhalb und zwischen den Wiederholungen (4/Gruppe) aufgeführt.

Tab. 10

Variationskoeffizienten

Code-Nr.	(1)	(3)	(5)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
+ s % 1)	34	47	23	38	40	27	36	38	31
+ s % 2)	6	6	21	12	16	12	23	11	15

1) innerhalb der Wiederholungen 2) zwischen den Wiederholungen

Die Standardabweichung innerhalb der Wiederholungen nimmt mit abfallender Thromboplastinzeit ebenfalls ab. Dies steht mit der hohen individuellen Variabilität der Thromboplastinzeit besonders bei 0 - 60 ppb Menadion-Versorgung in Zusammenhang (siehe auch C., 1.6.5).

Die Variationskoeffizienten zwischen den Wiederholungen (= Käfigeinheiten) waren mit 6 % für die 0 und 60 ppb Menadion-Gruppen mit 15 ppm Cumatetralyl (und 1 ppm Cumatetralyl in der Vorperiode) kleiner ausgefallen als in den beiden anderen Gruppierungen mit 10 (1) bzw. 15 (0) ppm Cumatetralyl (12, 16 % bzw. 23, 11 %). Auch dieser Befund dürfte die Begünstigung der 0, 60, 120 ppb Menadiondosierungsreihe bei 15 (1) ppm Cumatetralyl in der Versuchsperiode (Vorperiode) für spätere Experimente rechtfertigen.

Es fällt dagegen weniger ins Gewicht, daß hier bei 120 ppb Menadion mit 21 % der höchste Variationskoeffizient (gegenüber 15 %) gemessen wurde, da bei relativ kleinen Mittelwerten der Thromboplastinzeit der geringe prozentuale Unterschied in der Standardabweichung auch nur kleine numerische Unterschiede in den Sekundenwerten der Thromboplastinzeit (16,7: 11,4 sec) ausweist.

3.3.2.4.2. Thromboplastinzeit und Mortalität

Der Vergleich der Ergebnisse der Versuchskriterien Thromboplastinzeit und Verlustrate zeigt, daß bei einer Durchschnitts-Thromboplastinzeit von 70 bis 80 sec innerhalb der 13tägigen Versuchsdauer kaum Todesfälle auftraten. Dabei wurden auch in den Gruppen mit den höchsten Menadion-Dosierungen (5), (9) und (12) Einzelwerte bis 140 sec gemessen. Anhand einer Eichkurve für das verwendete Thromboplastin (homologes Kükenhirnthromboplastin), die mit Mischplasma Proben nicht depletierter Broilerküken angefertigt wurde, war zu erkennen, daß Thromboplastinzeiten von 70 bis 80 sec einer Verdünnung des Plasmas auf weniger als 10 % der Norm entsprechen. Bei einer Reduzierung der Vitamin K-abhängigen Faktoren auf weniger als 10 % der Norm traten somit zunächst nur vereinzelt Todesfälle auf. Bei weiterer Verringerung, etwa oberhalb einer mittleren Thromboplastinzeit von ca. 120 sec, stieg die Mortalität rasch an.

3.3.2.4.3. Thromboplastinzeit und Gewichtsentwicklung

Zwischen Thromboplastinzeit und Gewichtsentwicklung in der Versuchsperiode bestand in den Gruppierungen mit 0, 60 und 120 ppb Menadion (bei 15 ppm Cumatetralyl) und Cumatetralyl-freier bzw. 1 ppm Cumatetralyl Vorfütterung (hier zusätzlich 30 und 90 ppb Menadion) eine statistisch gesicherte negative Korrelation. Im einzelnen wurden folgende Korrelations- und Regressionskoeffizienten errechnet (Tab. 11).

Tab. 11

Korrelation zwischen Thromboplastinzeit und Gewichts-
entwicklung

ppb Menadion	0,30,60,90,120	0,50,100	0,60,120
ppb Cumatetralyl			
Versuchsperiode	15	10	15
ppm Cumatetralyl			
Vorperiode	1	1	-
r	- 0,59	- 0,51	- 0,87
P	< 0,01	> 0,05	< 0,001
b _{x/y}	- 0,31	- 0,25	- 0,55
b _{y/x}	- 1,13	- 1,15	- 1,39

3.3.2.4.4. Thromboplastinzeit und Futterverwertung

Von den Korrelationskoeffizienten der 3 verschiedenen Menadion/Cumatetralyl-Gruppierungen war nur derjenige ($r = 0,69$) der Gruppen (1) - (5) mit 0, 30, 60, 90 und 120 ppm Menadion (15 ppm Cumatetralyl) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1 % signifikant. Das bedeutet, daß hier die Tiere mit erhöhten Thromboplastinzeiten einen Mehraufwand an Futter pro Zunahmeeinheit benötigten.

Die Korrelationskoeffizienten der anderen Gruppierungen lagen knapp über der Signifikanzschwelle von $P = 0,05$.

4. Versuch III

Aufgabe von Versuch III war die vergleichende Stabilitätsprüfung von MSB und MPB unter Berücksichtigung von Futterlagerung und -behandlung (Pelletieren). Als Menadion-Dosierungen wurden 25, 50 und 100 ppb Menadion gewählt. Die Cumatetralyl-Dosierung in der Vorperiode betrug 1 ppm, im Versuchsabschnitt 15 ppm.

Da die Ergebnisse dieser biologischen Untersuchungen von chemisch-analytischen Menadion-Bestimmungen begleitet werden sollten, war es notwendig, Futterproben mit relativ hohem (10 ppm) Menadion-Gehalt herzustellen, die einerseits eine sichere chemisch-analytische Menadion-Bestimmung erlauben, andererseits aber auch bei Verschneiden mit der Vitamin K - armen Basalration auf Menadion-Konzentrationen von 25, 50 bzw. 100 ppb Menadion eine ansonsten bedarfsgerechte Nährstoffversorgung der Küken gewährleisten.

Die Futterproben wurden deshalb als Kükenaufzuchtmehl hergestellt (Ergänzungsfutter für Küken nach Ziffer 1.13 der Normentafel für Mischfuttermittel in der Fassung der 6. DVO zur Durchführung des Gesetzes zur Änderung futtermittel-rechtlicher Vorschriften vom 17.VII.1973, die uns zum Zeitpunkt der Versuchsplanung bereits vorlag).

Die beiden Menadion-Präparationen lagen in folgender Form vor:

MSB als weißes, kristallines, frei fließendes Pulver;
Chargen-Nr.: Op 187891; Verpackung: Plastiktüte in abgeschlossener Metalldose; Reinsubstanz-Menadiongehalt 52%
MPB im Verhältnis 1:1 mit stabilisierenden Getreideträgern und sauren Salzen gemischt; fahlgelblich, feinkörniges, frei fließendes Pulver; Chargen-Nr.: Op 179866; Verpackung wie MSB; Menadiongehalt 22,7 %.

Beide Präparate wurden von der Firma Hoffmann - La Roche AG, Grenzach (Baden) zur Verfügung gestellt.

Die Menadion-Anteile wurden chemisch-analytisch überprüft und mit 53,1 % Menadion (MSB) bzw. 23,7 % Menadion (MPB) jeweils $\pm$ 10 % auch bestätigt (siehe auch C.,4.3.5.1.)

Die Konzentrate waren 45 Tage vor Tag 0 des unter C.,4.1. geschilderten Zeitschemas angeliefert worden. Sie wurden anschließend unter Ausschluß von Licht- und Lufteinwirkung im Kühlschrank (+ 4 Grad Celsius) aufbewahrt.

4.1. Versuchsplan

65 Tage vor Beginn der Versuchsperiode des Tierexperiments wurden 100 kg Kükenaufzuchtmehl unter Verwendung der Komponenten der Vitamin K - armen Basalration hergestellt. Über seine Zusammensetzung unterrichtet Tab. 12.

Tab. 12

Rationszusammensetzung Kükenaufzuchtmehl

	%
Sojaextraktionsschrot (48,5 % RP)	40,0
Mais	20,0
Maisstärke	31,6
Sojaöl	2,0
Dicalciumphosphat	4,0
Futterkalk, kohlensauer	1,5
Viehsalz	0,4
Spurenelementvormischung ⁺⁾	<u>0,5</u>
	100,0

⁺⁾ Spurenelementvormischung enthält auf Sojaschrot
in 5 g (= entsprechend 1 kg der fertigen Mischung):

Fe (als Sulfat)	44 mg
Zn (als Sulfat)	28 mg
Mn (als Sulfat)	46 mg
Cu (als Sulfat)	5 mg

Das Kükenaufzuchtmehl enthält typengerecht relativ hohe Gehalte an Calcium und Phosphor. Da die Ca/P - Quellen, wie Calciumkarbonat und Dicalciumphosphat, als basische Mineralsalze auf Vitamin K - aktive Verbindungen stabilitäts-mindernd wirken (44), wurde damit eine zusätzliche Anforderung an die Stabilität der beiden Präparate gestellt.

Gemäß nachstehendem chronologischen Schema erfolgte dann die Behandlung des Kükenaufzuchtmehls:

Tag 0 100 kg Kükenaufzuchtmehl
Je 25 kg Kükenaufzuchtmehl wurden je 10 ppm Menadion aus MSB bzw. MPB zugemischt. Jede dieser beiden Chargen wurde zur Hälfte in Mehlform belassen und zur anderen Hälfte pelletiert (ohne Dampf!). Somit waren 4 Futterproben entstanden:
A 1 10 ppm Menadion aus MSB mehlförmig
A 2 10 ppm Menadion aus MSB pelletiert
A 3 10 ppm Menadion aus MPB mehlförmig
A 4 10 ppm Menadion aus MPB pelletiert,
die unter Zimmertemperatur in Papptonnen (unter Lichtausschluß) für 64 Tage gelagert wurden.

Die verbleibende Menge Kükenaufzuchtfutter (50 kg) wurde ohne Menadion-Zusatz unter gleichen Lagerungsbedingungen über denselben Zeitraum aufbewahrt.

Tag 63 Herstellung der Vitamin K - armen Basalration

Tag 64 I. Die restliche Menge (50 kg) Kükenaufzuchtmehl wurde in 2 Partien zu je 25 kg aufgeteilt, denen je 10 ppm Menadion aus MSB bzw. MPB zugesetzt wurden. Jeweils die Hälfte dieser Mischungen wurde in Mehlform belassen bzw. pelletiert (ohne Dampf!):

- B 1 10 ppm Menadion aus MSB mehlförmig
- B 2 10 ppm Menadion aus MSB pelletiert
- B 3 10 ppm Menadion aus MPB mehlförmig
- B 4 10 ppm Menadion aus MPB pelletiert

II. Vermahlen der pelletierten Futterproben
A 2, A 4, B 2 und B 4.

III. Herstellung der Untermischungen (= Versuchsrationen): Jede der (jetzt in mehlförmigem Zustand vorliegenden) Futterproben A1, A 2, A 3 und A 4 sowie B 1, B 2, B 3 und B 4 wurde zu je 0,25 % (α), 0,5 % (β) und 1 % (γ) in die bereits hergestellte (63. Tag) Basalration (zu Lasten eines gewichts-gleichen Teils der Basalration) eingebracht und homogen vermischt.

Somit waren insgesamt 24 Versuchsrationen entstanden, die in der Versuchsperiode (ein Tag danach) den Kühen zum Verzehr angeboten wurden. Von jeder der genannten Futterproben (A 1 - A 4, B 1 - B 4) lagen Untermischungen (= Versuchsrationen) mit einem Menadion-Sollgehalt von 25, 50 und 100 ppb vor, die in der Folge als α , β bzw. γ bezeichnet wurden.

Diese Versuchsanlage erlaubt eine Versuchsauswertung nach den Einflüssen MSB und MPB, A (gelagert) und B (ohne Lagerung), Mehl- und Pelletform und den Menadion-Konzentrationen der Versuchsrationen α , β und γ (sowie nach Interaktionen, z.B. MSB-Mehl und MSB-Pellets, MPB-Mehl und MPB-Pellets).

4.2. Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Zu Beginn der 28tägigen Vorperiode wurden je 15 Eintagsküken (♂) auf 48 Käfigeinheiten verteilt.

Die Basalration enthielt für alle Tiere 1 ppm Cumatetralyl. Die Mortalitätsrate in der Vorperiode betrug 2 % (16 von 720 Tieren).

Am 28. Tag der Vorperiode wurden 48 annähernd gewichtsgleiche Gruppen zu je 13 Tieren zusammengestellt (Gesamt-tierzahl 624). Das mittlere Körpergewicht der Tiere betrug 616 g.

Am Ende der Vorperiode wurde die Thromboplastinzeit von 24 Küken aus verschiedenen Käfigen bestimmt. Sie lag im Durchschnitt bei $38,1 \pm 8,9$ sec.

Unmittelbar nach Wiegung und Verteilung der Tiere im Raum am 28. Tag wurden die Testrationen angeboten. Der 29.Tag nach Aufstallung gilt als 1. Tag der 14tägigen Versuchsperiode (Gesamtversuchsdauer 42 Tage). Am 2. und jedem zweiten darauffolgenden Tag, also an insgesamt 7 Testtagen, wurde die Thromboplastinzeit eines Kükens je Käfig gemessen. Die Zahl der Einzelbestimmungen pro Ration betrug demnach 14. Am 7. und 14. Tag der Versuchsperiode wurden die Broiler gewogen.

Die weitere Versuchsdurchführung entsprach dem unter C., 1.1. - 1.6. bereits beschriebenen Verfahren. Als Versuchskriterien dienten Thromboplastinzeit, Mortalität, Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung.

4.3. Ergebnisse

Bei allen Versuchskriterien erwies sich als vorteilhaft, die Ergebnisse der übergeordneten Einflüsse gegeneinander zu vergleichen (z.B. MPB gegen MSB, A gegen B usw.). Dies

geschieht aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit und zur Verdeutlichung der Ergebnisse. Diese Art der Versuchsauswertung ergibt sich auch aus der im Vergleich zu den Versuchen I und II geringeren Tierzahl und Anzahl an Thromboplastinzeit-Bestimmungen pro Versuchsration. Sie ist gleichzeitig geeignet, die eingangs genannten Versuchsfragestellungen zu beantworten.

4.3.1. Mortalität

Die höchsten Verluste traten erwartungsgemäß in den α -Rationen auf (insgesamt 24 %). Schon in der Gruppe β ging die Zahl der Todesfälle auf 9 % zurück ($P < 0,001$). Bei den γ -Rationen war sie auf durchschnittlich 7 % erniedrigt. Die Unterschiede zwischen den Rationsgruppen A (gelagert) und B (nicht gelagert), Mehl- und Pelletform sowie MSB und MPB waren nicht ($P > 0,05$) ausgeprägt.
(Tab. 13).

Tab. 13

Verlustrate in der Versuchsperiode Versuch III

<u>Rationsgruppen (Einflüsse)</u>	<u>Mortalität %</u>
α	24
β	9
γ	7
MSB	12
MPB	15
Mehlform	12
Pelletform	15
A (gelagert)	13
B (nicht gelagert)	14
MSB-Mehl	13
MSB-Pellets	10
MPB-Mehl	10
MPB-Pellets	20

4.3.2. Gewichtsentwicklung

Einen Überblick über die Gewichtszunahme der Broiler in der Versuchsperiode gibt Tab. 14:

Tab. 14

Gewichtsentwicklung in der Versuchsperiode Versuch III

<u>Rationsgruppen (Einflüsse)</u>	<u>Zunahme (g / Tier)</u>
α	322
β	338
γ	379
MSB	354
MPB	339
Mehlform	350
Pelletform	342
A (gelagert)	352
B (nicht gelagert)	340
MSB-Mehl	348
MSB-Pellets	359
MPB-Mehl	352
MPB-Pellets	326

$\alpha - \gamma : P < 0,01; \quad \beta - \gamma : P < 0,05$

Bedingt durch die relativ hohen Streuungen innerhalb der verschiedenen Rationsgruppen waren lediglich Unterschiede bei den verschiedenen Menadion-Dosierungen α , β und γ der Versuchsrationen statistisch abzusichern. Bemerkenswert geringe Zunahmen waren bei den Broilern der Rationsgruppe MPB-Pellets zu verzeichnen (326 g). Eine Gegenüberstellung der Tab. 14 (Gewichtszunahme) und Tab. 13 (Mortalität) verdeutlicht ein hohes Maß an Übereinstimmung der Ergebnisse beider Versuchs-kriterien.

Interessanterweise wurde durch die Erhöhung der Menadion-Dosierung von 25 auf 50 ppb Menadion einmal die Mortalität am stärksten gesenkt, andererseits führte erst eine Erhöhung von 50 auf 100 ppb Menadion zu signifikanten Mehrzunahmen.

4.3.3. Futtermverzehr und Futterverwertung

Die Futtermverzehrswerte und die Futterrohverwertungsdaten (Tab. 15) zeigten ähnlich den Ergebnissen von Mortalität und Gewichtsentwicklung ebenfalls nur relativ geringe rationsbedingte Unterschiede.

Tab. 15

Futtermverzehr und -verwertung in der Versuchsperiode
Versuch III

Rationsgruppen (Einflüsse)	Verzehr (g/Tier und Tag)	Futterverwertung (g Futter/g Zunahme)
α	59,1	2,72
β	61,5	2,63
γ	65,1	2,46
MSB	62,0	2,54
MPB	61,8	2,71
Mehl	62,7	2,59
Pellets	61,2	2,62
A (gelagert)	61,9	2,56
B (nicht gelagert)	62,0	2,64
MSB-Mehl	62,4	2,62
MSB-Pellets	61,6	2,47
MPB-Mehl	62,9	2,56
MPB-Pellets	60,7	2,77
	$\alpha - \gamma: P < 0,01$	$\alpha - \gamma: P < 0,05$
	$\beta - \gamma: P < 0,05$	MPB-Pellets - MSB-Pellets: $P < 0,05$

Eine statistische Überprüfung ergab lediglich gesicherte Unterschiede bei den nach Menadion-Sollgehalt (α, β, γ) zusammengefaßten Gruppen. So lag der Verzehr der Gruppen γ signifikant über dem der Gruppen β ($P < 0,05$) bzw. Gruppen α ($P < 0,01$).

Die Rohverwertungsdaten der Gruppen γ waren von den Werten der Gruppen α signifikant verschieden ($P < 0,05$), ebenso die Gruppen MPB-Pellets von MSB-Pellets ($P < 0,05$).

Zwischen allen übrigen Gruppierungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der Versuchskriterien Mortalität und Gewichtsentwicklung wurden allerdings bestätigt, besonders ausgeprägt am Beispiel der Rationsgruppe MPB-Pellets, die auch hier, sowohl im Verzehr als auch in der Futterverwertung, merklich von den Werten der vergleichbaren Rationsgruppen abwich.

4.3.4. Thromboplastinzeit

Tab. 16

Thromboplastinzeit Versuch III

Rationsgruppen (Einflüsse)	Thromboplastinzeit (sec)
α	146,7
β	124,2
γ	103,1
MSB	121,1
MPB	128,3
Mehlform	118,0
Pelletform	131,4
A (gelagert)	123,2
B (nicht gelagert)	126,2
MSB-Mehl	122,1
MSB-Pellets	120,1
MPB-Mehl	113,9
MPB-Pellets	142,6

Mit Hilfe der Varianzanalyse konnten unter Berücksichtigung der bekannten Variationsursachen folgende Ergebnisse der übergeordneten Gruppierungen auch statistisch abgesichert werden:

Signifikant ($P < 0,001$) unterschieden sich die Thrombo-

plastinzeiten der Gruppierungen α , β und δ , Mehl und Pellets sowie MPB-Pellets von MPB-Mehl, MSB-Mehl und MSB-Pellets.

Signifikant ($P < 0,05$) niedriger waren die Thromboplastinzeiten im Mittel der MSB-Gruppen gegenüber den MPB-Gruppen, was aber nahezu ausschließlich auf den Einfluß der MPB-Pellet-Rationen zurückzuführen ist.

Zwischen der Vitamin K-Aktivität der Futterproben MSB-Mehl (A 1 und B 1) und MPB-Mehl (A 3 und B 3) bestand kein signifikanter Unterschied. Der niedrigere Mittelwert in der Thromboplastinzeit der Gruppierung MPB-Mehl resultiert allein aus den relativ niedrigen Thromboplastinzeiten der α -Gruppen (25 ppb Menadion-Sollgehalt). Die Werte der entsprechenden β - und δ -Gruppen und die korrespondierenden MSB-Daten waren nahezu identisch.

Für alle Untermischungen der 8 Futterproben (A 1 - A 4, B 1 - B 4) ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Thromboplastinzeit von der Höhe der Menadion-Dosierung (25, 50, 100 ppb). Die Thromboplastinzeiten wurden mit steigender Menadion-Dosierung kürzer. Die Korrelationskoeffizienten waren aber, bedingt durch relativ hohe Streuungen und die geringe Anzahl der Wiederholungen, nur für die Untermischungen der Futterproben A 1 ($r = - 0,85$; $P < 0,05$), A 2 ($r = - 0,92$; $P < 0,05$), A 3 ($r = - 0,90$; $P < 0,05$) und B 3 ($r = - 0,96$; $P < 0,01$) signifikant.

Da die ca. zweimonatige Lagerzeit der verwendeten Menadion-Präparate im Kükenaufzuchtmehl ohne einen über die Thromboplastinzeit nachweisbaren Einfluß auf die Vitamin K-Aktivität geblieben war (Tab. 16), wurden zu weiteren Berechnungen die entsprechenden Werte der A- (gelagert) und B- (nicht gelagert) Serie addiert (für MSB und MPB in Mehl- bzw. Pelletform). Für die so entstandenen 4 Rationsgruppierungen ergaben sich

folgende Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten (Tab. 17):

Tab. 17

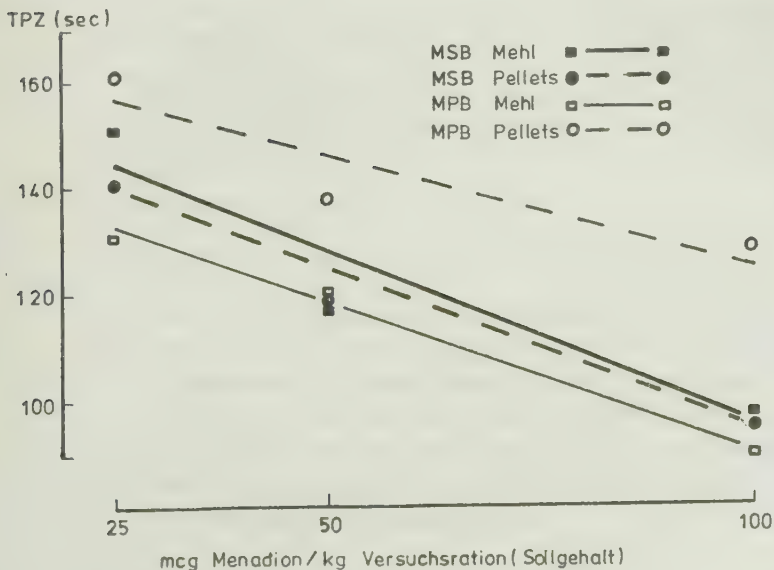
Beziehungen zwischen Thromboplastinzeit und Menadion-Angebot aus verschiedenen Menadion-Präparationen und Futtertypen

Gruppierung	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
MSB-Mehl	$y = 161,2 - 0,67 x$	$r = - 0,81$	$P < 0,01$
MSB-Pellets	$y = 155,2 - 0,60 x$	$r = - 0,85$	$P < 0,001$
MPB-Mehl	$y = 146,2 - 0,55 x$	$r = - 0,91$	$P < 0,001$
MPB-Pellets	$y = 166,5 - 0,41 x$	$r = - 0,63$	$P < 0,05$

Die entsprechenden Regressionsgeraden der Tab. 17 sind in Abb. 17 grafisch dargestellt.

Abb. 17 - Thromboplastinzeiten von Cumatetralyl-belasteten Broilern (σ^7) bei steigenden Dosierungen der Menadion-Derivate MSB und MPB

25 Tage Vorperiode - 13 Tage Versuchsperiode
im Mittel/Kurvenpunkt: 28 Tiere



Die Regressionsgeraden von MSB-Mehl und MSB-Pellets sowie MPB-Mehl liegen in einem Bereich, in dem die korrespondierenden Geradenpunkte für 50 und 100 ppb Menadion nur geringfügig in den Sekundenwerten der Thromboplastinzeit differieren. Die Regressionsgerade für MPB-Pellets hebt sich hiervon deutlich ab. Besonders die geringe Steigung der Geraden ($b = - 0,41$) überrascht hier zunächst.

Dabei sollte berücksichtigt werden, daß die Steigung der Geraden anhand der Sollwerte für den Menadion-Gehalt errechnet wurde. Da hier offensichtlich ein erheblicher Verlust an Vitamin K-Aktivität infolge Pelletierens entstanden war, lag der Gehalt an biologisch wirksamem Menadion wesentlich niedriger. In welcher Größenordnung sich der Aktivitätsverlust in etwa bewegt, kann bereits ein Vergleich der Meßwerte der Rationen A 4 δ^* und B 4 δ^* (100 mcg Menadion-Sollgehalt) mit den Meßwerten der β -Rationen (50 mcg Menadion-Sollgehalt) mit den Futterproben A 1, A 2, A 3, B 1, B 2 und B 3 zeigen. Da die A 4 δ^* - und B 4 δ^* -Werte noch höher lagen als die β -Werte (halber Menadion-Sollgehalt) jener Rationen, kann der Aktivitätsverlust auf ca. 50 % geschätzt werden.

Errechnet man die Regressionsgerade, indem anstelle des Sollgehalts eine um 50 % niedrigere Menadion-Konzentration eingesetzt wird, so erhöht sich der Regressionskoeffizient dieser hypothetischen Geraden auf $b = - 0,82$ und liegt damit noch über dem Bereich der Gruppierungen MSB-Mehl und MSB-Pellets mit 0,67 bzw. 0,60.

4.3.4.1. Vergleich der Thromboplastinzeiten mit den
übrigen Versuchs-kriterien

Ein Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Versuchs-kriterien zeigt deutlich, daß die Thromboplastinzeit den Vitamin K - Versorgungsstatus der Versuchstiere am besten widerspiegelt. Dennoch aber bestehen zwischen Thromboplastinzeit und den anderen Kriterien Verlustrate, Gewichtsentwicklung sowie Futterverzehr und -verwertung enge Beziehungen (Tab. 18).

Tab. 18

Korrelationen zwischen Thromboplastinzeit und Mortalität,
Gewichtsentwicklung, Futterverzehr bzw.-verwertung
(aus den Mittelwerten der 48 Einzelkäfige)

Kriterien	Korrelations- koeffizient	Signifikanz
Thromboplastinzeit-Mortalität	$r = 0,51$	$P < 0,001$
Thromboplastinzeit-Gewichtszunahme	$r = - 0,44$	$P < 0,01$
Thromboplastinzeit-Futterverzehr	$r = - 0,42$	$P < 0,01$
Thromboplastinzeit-Futterverwertung	$r = 0,37$	$P < 0,01$

Die Signifikanz der verschiedenen Korrelationen erlaubt die Aussage, daß die aus den Thromboplastinzeit-Werten gewonnenen Schlußfolgerungen durch die Ergebnisse der anderen Kriterien weitgehend gestützt werden. Die Aussicht, aus der Thromboplastinzeit den Vitamin K - Versorgungsstatus fehl einzuschätzen, dürfte deshalb verhältnismäßig gering sein.

4.3.5. Vergleichende Werthbemessung von MSB und MPB als Vitamin K - Quellen

4.3.5.1. Chemische Analysen-Daten

Wie schon unter C.4. erwähnt, wurde parallel zum Tierexperiment der Menadion-Gehalt der Präparationen über 211 Tage sowie der 8 verschiedenen Kükenaufzuchtmehl-Chargen (A 1 - A 4, B 1 - B4) über 171 Tage bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 sowie Tab. 20 aufgeführt.

Das Analysen-Verfahren geht auf MENOTTI (1942) zurück und wurde von GRIMM und TIEWS (1972) modifiziert. Die Wiederauffindungsrate dieses Verfahrens liegt für Konzentrate (Vitamin - Reinsubstanzen bzw. Vormischungen) bei 100 %, für Futtermischungen bei 90 %. Die analytische Fehlerbreite wird für die Konzentrate mit ± 10 %, für Futtermischungen mit ± 20 % angegeben.

Jeder der angegebenen Analysen-Werte setzt sich aus drei Einzelwerten zusammen, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt wurden.

Tab. 19

Ergebnisse der chemischen Analyse der Vitamin K -
Konzentrate

Tag +)	% Menadion	
	Vitamin K - MSB	Präparation MPF
- 8	53,1	23,7
80	48,3	21,8
97	51,1	21,2
203	51,2	20,9

+) ausgehend vom Tag 0: Herstellung der Kükenaufzuchtmehl - Futterproben

Wie Tab. 19 ausweist, blieb der Menadion-Gehalt der Präparate MSB und MPB im Untersuchungszeitraum (211 Tage) unter Berücksichtigung der analytischen Fehlerbreite ($\pm 10\%$) konstant. Die Mittelwerte aus allen Analysen stimmen mit 50,9 % Menadion für MSB bzw. 21,9 % für MPB recht gut mit den angegebenen Sollwerten beider Präparationen (52 % bzw. 22,7 %) überein. Beiden Präparationen kann daher eine ausreichende Stabilität bescheinigt werden.

Tab. 20

Ergebnisse der chemischen Analyse der Kükenaufzuchtmehl-
Futterproben A 1 - A 4, B 1 - B 4 (Sollgehalt: 10 ppm Menadion)

Tag ⁺⁾	ppm Menadion							
	A 1	A 2	A 3	A 4	B 1	B 2	B 3	B 4
2	8,5	9,2	8,3	8,1	-	-	-	-
16	9,1	9,2	8,8	9,2	-	-	-	-
32	8,1	8,3	8,4	8,1	-	-	-	-
65	8,3	8,9	8,5	8,1	8,4	9,2	8,8	8,3
79	9,1	9,0	8,3	8,0	8,5	8,1	8,3	8,0
104	9,2	8,0	8,2	6,8	8,4	7,7	8,3	7,0
172	8,3	6,2	5,8	5,0	8,3	5,7	5,6	5,0

⁺⁾ ausgehend vom Tag 0: Herstellung der Kükenaufzuchtmehl -
Futterproben

Diese Aussage muß allerdings umgehend eingeschränkt werden, wenn die Stabilität der MSB- und MPB-Präparationen in Untermischungen (hier Kükenaufzuchtmehl) angesprochen wird.

Unter Berücksichtigung von Wiederauffindungsrate (90 %) und analytischer Fehlerbreite ($\pm 20\%$) traten in den Futterproben bis zum 79. Tag nach Herstellung der Futtermischungen keine Unterschiede zum Sollgehalt von 10 ppm Menadion auf. Im einzelnen wurden aus

5 zeitlich verschiedenen (2., 16., 32., 65. und 79. Tag) Untersuchungsreihen für MSB in den mehlförmigen und pelletierten Futtertypen 8,6 bzw. 8,9 ppm Menadion ermittelt. Für die korrespondierenden MPB-Futterproben (A 3 und A 4) wurden 8,5 bzw. 8,3 ppm Menadion analytisch aufgefunden.

Die korrespondierenden Werte der A - Futterproben zeigten bis zum 79. Tag keine Unterschiede zu den B - Chargen (A: 8,6 ppm, B: 8,5 ppm Menadion), obwohl die Einbringung von Menadion aus identischen Menadion-Präparationen in die Futterproben 64 Tage früher erfolgt war als in die B - Futterproben.

Damit darf aus den Ergebnissen der chemischen Analyse ebenso wie aus den tier-experimentellen Daten (Tab. 16) geschlossen werden, daß die unterschiedliche Lagerungsdauer der Menadion-haltigen Futterproben über 79 (Futterproben A) bzw. 14 Tage (Futterproben B) ohne Einfluß auf den Menadion-Gehalt geblieben war.

Darüberhinaus (80. - 172. Tag) allerdings vollzog sich eine deutliche Abnahme der Menadion-Konzentration, besonders in den pelletierten MPB-Futterproben, ebenfalls meßbar aber auch in den mehlförmigen MPB- sowie in den pelletierten MSB-Futterproben. Bereits am 104. Tag war der Menadion-Gehalt in beiden MPB-Pellet-Futterproben A und B auf 69 % des rechnerischen Ausgangswertes von 10 ppm gefallen (MSB-Pellets: 79 %). Dieselben Futterproben wiesen am letzten (172.) Untersuchungstag nur noch 50 % des rechnerischen Sollgehalts an Menadion auf. Bezogen auf die erstermittelten Analysenwerte betrug der Menadionverlust 39 %. Zu diesem Zeitpunkt waren schließlich auch die Menadion-Konzentrationen der MPB-Mehl-Futterproben A und B

auf durchschnittlich 57 % (bezogen auf Sollgehalt) bzw. 67 % (bezogen auf den ersten Analysenwert) abgesunken. Für die MSB-Pellet-Futterproben A und B gilt ähnliches (Menadion-Verlust 40 bzw. 35 % bezogen auf Soll- bzw. Analysengehalt). Allein die MSB-Mehl-Futterproben A und B waren in ihrem Menadion-Gehalt nach 172 Tagen mit 8,3 ppm den Analysen-Werten von Tag 2 (bzw. 65) mit 8,5 ppm noch direkt vergleichbar.

Damit waren gemessen an den Ergebnissen der chemisch-analytischen Untersuchungen 3 Faktoren auf das Menadion-Stabilitätsverhalten von entscheidendem Einfluß:

- 1.) Das Alter der Menadion-Präparationen, da kein Unterschied im Menadion-Gehalt der Futtertypen A und B im Untersuchungszeitraum sich etablieren konnte; nicht dagegen die Dauer des Eingebraught-seins in den Futterproben.
- 2.) Die Menadion-Präparation, Menadion aus MPB verhielt sich anfänglich in den pelletierten, später aber auch deutlicher in den Mehl-Futterproben wesentlich instabiler als Menadion aus MSB.
- 3.) Die Behandlung der Futterproben, da in den Pellet-Futterproben ein deutlicherer Abfall des Menadion-Gehalts als in den Mehl-Futterproben auftrat.

4.3.5.2. Biologische Bewertung anhand tier-experimenteller Daten

Im Gegensatz zu den chemischen Analysen-Werten beziehen sich die tier-experimentellen Daten nur auf einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum von 14 Tagen (65. - 79. Tag).

Die in Abb. 17 aufgezeigten Verhältnisse zwischen Menadion-Gehalt im Futter und Thromboplastinzeit in Abhängigkeit von 2 verschiedenen Menadion-Quellen sowie der Futterbehandlung (in Mehlform belassen oder pelletiert) lassen sich in einem von CAVALLI-SFORZA (1969) angegebenen statistischen Verfahren weiter berechnen. Die Eignung dieses Rechenverfahrens für ähnlich gelagerte Bestimmungen von Vitamin - Aktivität in verschiedenen Futterproben konnte von BAUMEISTER (1973) für den Vitamin D₃ - Test an der Japanischen Wachtel gezeigt werden.

In diesem Verfahren erfolgt die Wertbemessung der zu prüfenden Proben durch Vergleich der Steigungen von den Wirkungsgeraden, die durch Standard- bzw. Prüfungen festgelegt sind. Das Verfahren ist an keine Bedingungen hinsichtlich der Anzahl von Dosen für die einzelnen Präparationen gebunden.

Aus den Versuchsdaten (Thromboplastinzeiten) läßt sich für ein beliebiges Prüfpräparat der wahrscheinliche Titer errechnen. Durch Multiplikation des Titers mit dem Sollgehalt der Probe ergibt sich dann der im Test bestimmte Vitamin-Gehalt.

Die Angabe des Titers wird vervollständigt durch die Errechnung der zugehörigen Standardabweichung sowie der Konfidenzgrenzen.

Vor Anwendung des Verfahrens erfolgt eine Gültigkeitskontrolle, ob nach diesem Modell überhaupt gerechnet werden darf mit Varianz-statistischen Mitteln.

Eine absolute Bewertung, beispielsweise im Vergleich zu einem Standardpräparat mit bekannter Stabilität, konnte aus den eingangs genannten Gründen nicht durchgeführt werden. Die beiden verglichenen Präparationen beinhalteten die "stabilsten" Menadion-Verbindungen. Es konnte somit nur MPB im Vergleich zu MSB bewertet werden. Da die Thromboplastinzeit der beiden MSB-Gruppierungen Mehl- und Pelletform bei den Untergruppen α , β und γ sowie die entsprechenden

Regressionsgeraden sehr eng beieinander lagen, so daß ein Unterschied zwischen beiden Gruppierungen nicht erkannt werden konnte ($P > 0,05$), dienten die Daten aller MSB-Gruppen als Standardwerte. Hierzu in Beziehung gesetzt wurden die Werte der MPB-Gruppierung Mehlform und der MPB-Gruppierung Pellets. In beiden Fällen war eine Wertbemessung zulässig.

Der Titer für die MPB-Gruppierung Mehlform (Kükenaufzucht-Futterproben A 3 und B 3) wurde mit $1,14 \pm 11 \%$ errechnet. Die besonders unter Anbetracht der geringen Menadion-Dosis in den Versuchsrationen (25, 50 und 100 ppb) relativ kleine Standardabweichung bestätigt die Empfindlichkeit des gewählten Parameters Thromboplastinzeit.

Die biologische Wirksamkeit von Menadion aus MPB würde sich demnach im Versuchszeitraum um den Faktor 1,14 höher belaufen haben als die Vitamin K - Aktivität von Menadion aus MSB. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 5 \%$ liegt allerdings der wahre Titer von MPB-Menadion im Rationstyp Mehlform zwischen 1,38 und 0,89, so daß ein echter Unterschied in der Vitamin K - Wirkung beider Präparationen bezogen auf Menadion hier nicht vorliegt.

Anders verhält es sich dagegen mit der MPB-Gruppierung Pellets (Kükenaufzucht-Futterproben A 4 und B 4). Hier wurde der Titer von Menadion aus MPB nur mit $0,50 \pm 23 \%$ errechnet. Damit war MPB-Menadion nur halb so stark als Vitamin K wirksam geworden wie Menadion aus MSB. Wie sich aus den 95 % Konfidenzgrenzen für den Titer 0,5 ablesen läßt, beträgt die geringere Vitamin K - Aktivität von MPB-Menadion höchstens 73 %, mindestens aber 27 % derjenigen von MSB-Menadion.

Aus den genannten Daten geht hervor, daß MPB der hier verwendeten Charge offensichtlich auch durch einen schonenden Pelletiervorgang (ohne Dampfzusatz) angegriffen und in seiner Vitamin K - Wirksamkeit teilweise zerstört wird.

D. DISKUSSION

Ein Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuche in absoluten Zahlenwerten ist trotz der allen drei Versuchen gemeinsamen Versuchstechnik kaum möglich. Dies gilt insbesondere auch für das Versuchskriterium Thromboplastinzeit. Die Unterschiede hinsichtlich Dauer der Vor- und Versuchsperiode, den jeweils für einen Versuch hergestellten Thromboplastin-Chargen und Menadion-Präparaten führten auch in den Rationsgruppen mit gleichen oder ähnlichen Wirkstoffdosierungen zu deutlich differierenden Ergebnissen. Die Relation der Ergebnisse zueinander innerhalb der jeweiligen Versuche war davon allerdings nicht betroffen.

Nicht unwesentlich dürften auch Einflüsse des hinsichtlich Belüftung, Beheizung und Beleuchtung nicht optimalen Stalles auf die Ergebnisse der einzelnen Versuche einzuschätzen sein. So konnten in Versuch II mit vier Wiederholungen pro Ration durch eine entsprechende Verteilung der Rationsgruppen im Raum die Stalleinflüsse für alle Gruppen weitgehend gleich gehalten werden. In Versuch III mit nur zwei Wiederholungen pro Ration waren die Stalleinflüsse dagegen nicht in einem wünschenswert gleichmäßigen Maß zu verteilen, was sich besonders auf die Ergebnisse der Versuchskriterien Gewichtszunahme und Futterverwertung in Richtung Erhöhung der Restvarianz auswirkte.

Nachfolgend werden zunächst die Ergebnisse der verschiedenen Versuchskriterien in der auch bei den einzelnen Versuchen eingehaltenen Reihenfolge diskutiert.

1. Mortalitätsrate

Die Mortalität in der Vorperiode wurde durch Zumischung von 1 ppm Cumatetralyl zur Vitamin K - armen Basalration nicht signifikant beeinflusst (Versuch II). Die Tierverluste

in Versuch II und III hielten sich mit 3,8 % (nur mit 1 ppm Cumatetralyl vorgefütterte Tiere) bzw. 2,0 % in den Grenzen (1 - 3 %), die bei der Broilerhaltung unter den geschilderten Bedingungen normalerweise auftreten. Die relativ hohe Mortalitätsrate in Versuch I dürfte nicht auf die Verwendung von Cumatetralyl, sondern eher auf einen zeitweiligen Ausfall der Heizung zurückzuführen sein.

Die Dauer der Vorperiode schien die Verlustrate ebenfalls nicht zu beeinflussen.

Während der Versuchsperiode zeigte sich in allen Versuchen, daß bereits relativ geringe Mengen der wasserlöslichen Menadion-Präparate ausreichen, um Cumatetralyl-bedingte Verluste zu vermeiden. Bei 15 ppm Cumatetralyl im Futter wurde die Mortalitätsrate in Versuch I durch 125 ppb Menadion im Futter von 40 %^{+) auf 3 % reduziert. 120 ppb Menadion verminderten in Versuch II bei gleicher Cumatetralyl-Verabreichung die Verluste von 47 %^{+) ebenfalls auf 3 %. Bei den γ -Rationsgruppen (100 mcg Menadion-Sollgehalt/kg Futter) von Versuch III verendeten in der Gruppierung MPB-Mehl nur 2 % der eingesetzten Tiere gegenüber 25 % in den α -Rationsgruppen (25 mcg Menadion-Sollgehalt/kg Futter).}}

Im Schrifttum finden sich nur wenige detaillierte Angaben über die Höhe der Mortalität bei vergleichbaren Versuchen. ANDERSON et al. (1954) verzeichneten in zwei Versuchen von 6 Wochen Dauer eine Mortalitätsrate von jeweils 10 % bei Angebot einer Vitamin K - armen Mais-Soja-Ration an New-Hampshire-Küken. Der Zusatz von 0,0125 % Sulfaquinoxalin zur Basalration führte zu einer Erhöhung der Verlustrate auf 17 % in einem Versuch, in einem anderen Versuch blieb derselbe Futterzusatz ohne Einfluß auf die Verlustrate (8 %). NELSON und NORRIS (1961 b) berichten von einer "hohen Mortalität" in drei Versuchen mit White Plymouth Rock - Küken.

+) jeweils ohne Menadion-Zusatz

Die Vitamin K - arme Basalration enthielt 0,1 % Sulfaquinoxalin, je einmal ergänzt mit 250 mcg Phyllochinon, 100 mcg MSB bzw. 200 mcg Menadion / kg Futter. Die Thromboplastinzeiten waren dabei auf 63 - 83 sec erhöht. Als Normalwerte werden von den Autoren 18 - 20 sec genannt.

DORN (1965) stellte tödlich verlaufende hämorrhagische Diathesen nach Sulfonamidbelastung fest, obwohl die Thromboplastinzeiten durch Futterumstellung und zusätzliche Vitamin K - Gaben im Normalbereich (Quickwert: 75 - 100 %) gehalten wurden.

In den eigenen Voruntersuchungen konnte DORN's Beobachtung bestätigt werden. Dieser Befund beeinflusste damit auch die Entscheidung zur Verwendung von Cumatetralyl anstelle des Sulfaquinoxalins als Vitamin K - Antagonisten.

PAKOSTA (1970) verfütterte an 12 Wochen alte Hy - Line - Hähnchen über einen Zeitraum von 97 Tagen 37,5 ppm Cumatetralyl im handelsüblichen Futter und konnte trotz Quickwertsenkungen unter 10 % keine klinischen Erscheinungen feststellen.

GRIMINGER und DONIS (1960) belasteten Küken mit unterschiedlichen Dicumarol-Dosierungen. Erst im Bereich von 1000 - 3000 mg Dicumarol pro kg Vitamin K - arme Basalration traten tödlich verlaufende Blutungen auf.

HARMS und TARVER (1957) verfütterten über einen Zeitraum von 36 Stunden 3300 ppm Dicumarol an Küken, ohne klinische Erscheinungen festzustellen. In eigenen Voruntersuchungen traten bei Dicumarol-Gaben bis zu 500 ppm keine Todesfälle auf.

Gemessen am Versuchskriterium Mortalität lassen sich zwischen Cumarin- und Sulfonamidderivaten beim Geflügel deutliche

Unterschiede feststellen, die auf den unter B., 3.S. 26 erwähnten Nebenwirkungen der Sulfonamide beruhen könnten.

Mit Cumatetralyl ist es gelungen, wie die Gesamtergebnisse zeigen, eine brauchbare Sensibilisierung des Tiermaterials (= Erhöhung des Vitamin K - Bedarfs) herbeizuführen, ohne gleichzeitig stark überhöhte Verluste in Kauf nehmen zu müssen.

2. Gewichtsentwicklung

ALMQUIST und STOKSTAD (1935) stellten fest, daß ein Mangel an Vitamin K solange keinen Einfluß auf das Wachstum hat, bis die Tiere an Hämorrhagien erkranken. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch DUA und DAY (1966), FROST et al. (1956) und GRIMINGER und DONIS (1960).

Aufgrund der Ergebnisse in Versuch I konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. 125 ppb Menadion brachten in der 5 ppm Cumatetralyl-, 250 ppb Menadion in der 10 ppm Cumatetralyl- und 500 ppb Menadion in der 20 ppm Cumatetralyl-Rationsgruppe Gewichtszunahmen, die von den jeweils höheren Menadion-Dosierungen nicht mehr signifikant übertroffen wurden.

In gewissem Gegensatz dazu steht die hochsignifikant bessere Gewichtsentwicklung der Cumatetralyl-frei vordepletierten Küken in Versuch II gegenüber den mit 1 ppm Cumatetralyl belasteten Küken, bei einer Differenz der Durchschnitts-Thromboplastinzeit von nur 7,7 sec und bei Fehlen jeglicher klinischer Symptome.

In den Versuchen II und III waren die Zunahmen bei den Rationen mit 15 ppm Cumatetralyl mit steigender Menadion-Dosierung positiv korreliert. Die Gewichtsentwicklung kann unter diesen Wirkstoffverhältnissen als Parameter der Vitamin K - Aktivität in Ergänzung der Thromboplastinzeit-Bestimmung herangezogen werden. Dieser Befund steht in

Einklang mit den obigen Ergebnissen, da in den Versuchen II und III die Menadion-Dosierung jeweils zwischen 0 und 120 ppb Menadion gelegen hatte.

3. Futtermverzehr und Futterverwertung

Der Futtermverzehr und die Futterverwertung der Küken wurden im Bereich extremer Vitamin K - Mangelversorgung (bei Quickwertsenkungen unter 10 %) deutlich dosisabhängig von der Menadion-Zufütterung beeinflusst.

Die genannten Kriterien stellen damit ebenfalls brauchbare, die Thromboplastinzeit ergänzende Parameter für den Grad der Vitamin K - Versorgung dar.

In der Literatur ist hierzu kein vergleichbares Zahlenmaterial zu finden. Von einigen Autoren, wie ANDERSON et al. (1962, 1956) und NELSON und NORRIS (1961 b) wurde zwar die Futterverwertung errechnet, doch standen entweder die Versuchstiere nicht in ausgeprägtem Vitamin K - Mangel, oder das Zahlenmaterial war zu klein, um signifikante Beziehungen oder Unterschiede nachweisen zu können.

4. Thromboplastinzeit

Die Thromboplastinzeit gilt in Übereinstimmung mit Literaturbefunden als der empfindlichste Parameter der Vitamin K - Versorgung.

In Versuch I konnte - bei entsprechender Sensibilisierung - über einen Bereich von 0 - 2000 ppb Menadion eine signifikante Beziehung zwischen Thromboplastinzeit und Menadion-Angebot aufgestellt werden. Die größten Unterschiede in der Thromboplastinzeit waren jeweils zwischen den Gruppen mit 0 und 100 - 125 ppb Menadion zu finden, was nicht weiter überraschte. In diesem Dosierungsbereich bestand in Versuch II eine lineare Beziehung zwischen Menadion-Konzentration im Futter und

Thromboplastinzeit. Die Ergebnisse können dadurch weit anschaulicher dargestellt und auch einfacher ausgewertet werden.

Die Standardabweichung des Parameters Thromboplastinzeit wurde in den hier vorgelegten Versuchen offensichtlich auch von der Verteilung der Rationsgruppen im Raum beeinflusst, was zunächst nicht erwartet werden mußte. Unter unseren Haltungsbedingungen dürfte sich daher eine Wiederholungszahl von 4 empfehlen, um Stalleinflüsse ausgleichen zu können.

Es erschien prinzipiell möglich, die ausgeprägte Beziehung zwischen Thromboplastinzeiten und Menadion-Konzentration im Futter durch Erhöhung des Cumatetralyl-Gehalts der Versuchsrationen über einen weiteren Menadion-Dosierungsbereich auszudehnen. Aus folgenden Gründen wurde aber auf eine Steigerung der Cumatetralyl-Dosierung verzichtet. Bereits bei 20 ppm Cumatetralyl stieg in Versuch I die Morbiditäts- und Mortalitätsrate, besonders in den Menadion-freien Rationsgruppen, steil an. Dazu kommt, daß sog. "Kümmerer" zu niedrigen Thromboplastinzeiten neigen. So wiesen beispielsweise in Versuch II von 26 Tieren, die um mehr als 15 % unter dem Durchschnittsgewicht der entsprechenden Rationsgruppe lagen, 21 Tiere Thromboplastinzeiten unter dem Rationsmittelwert auf ($P < 0,05$). Bei hoher Mortalität besteht andererseits die Gefahr, daß die Versuchstierzahl während des Versuchs so stark abnimmt, daß entweder dieselben (überlebenden) Tiere mehrmals für eine Thromboplastinzeit-Bestimmung herangezogen werden müßten, was den Versuchsfehler erhöhen dürfte, oder daß die Tierzahl zu Versuchsbeginn so hoch angesetzt werden müßte, daß letztlich Versuchsaufwand und Versuchsaussage nicht mehr in einem brauchbaren Verhältnis stehen.

Wie unter B., 4.2. angeführt, lassen sich Thromboplastinzeiten verschiedener Versuchsreihen erst nach Umrechnung

in Quick-%-Werte miteinander vergleichen. Voraussetzung dafür ist die Erstellung einer Eichkurve für jede verwendete Thromboplastin-Charge. Für die Auswertung der Versuchsergebnisse wurde aber bewußt auf eine solche Umrechnung verzichtet, da die Thromboplastinzeiten überwiegend im Bereich von weniger als 5 % Quick-Wert lagen, und sich beispielsweise eine Thromboplastinzeit von 150 sec in Quick-%-Werten ausgedrückt, zahlenmäßig kaum mehr vom Quick-Wert für 120 sec unterscheiden würde. Als Anhaltspunkt seien hier nur die Sekundenwerte der Thromboplastinzeit bei einer Plasmaverdünnung auf 10 % (= 10 % Quick-Wert) erwähnt. Sie betrugen für die einzelnen Thromboplastin-Chargen in Versuch I und II je 32,4 sec, in Versuch III 33,3 sec.

Auch die Mehrzahl der Autoren verzichtet aus diesen Gründen ebenfalls auf eine derartige Umrechnung.

5. Vitamin K - Aktivität und Stabilitätsverhalten von MSBC u. MPB

GRIMINGER (1965 b) verglich die Präparate MSBC (33 % Menadion-Gehalt) und MPB (45 % Menadion-Gehalt) im Kükentest mit 0,2 % Sulfaquinoxalin im Futter als Antikoagulans. Die Vitamin K - Wirksamkeit von MPB war auf Gewichtsbasis bezogen um den Faktor 1,8 höher ausgefallen als von MSBC, obwohl der Menadion-Gehalt von MPB nur um den Faktor 1,36 denjenigen von MSBC übertrifft.

FROST et al. (1956) kamen zu dem Ergebnis, daß Menadion aus MSBC dreimal - in Gegenwart von 0,1 % Sulfaquinoxalin sogar 6-10 mal - so wirksam sei wie reines Menadion.

Auch DUA und DAY (1966) verwendeten 0,1 % Sulfaquinoxalin als Stressagens. Sie fanden, ähnlich GRIMINGER (1965 b), ein Aktivitätsverhältnis von 1 : 1,9 zugunsten des MPB auf Gewichtsbasis im Vergleich zu MSBC.

DAY (1967) berichtet von einem Aktivitätsverhältnis MSBC : MPB wie 1 : 2,11 bei Verwendung des Antikoagulans Pivalyl. Gegenüber Druck und Hitze erwies sich MPB (Hetraceen) den anderen getesteten Menadion-Präparaten (verschiedene MSB- und MPB-Präparate) als Überlegen.

Bei CHARLES et al. (1968) lag das Verhältnis der Wirksamkeit von Menadion aus MSBC und MPB zwischen 1 : 1,89 und 1 : 10,4 je nach Antikoagulans (Dicumarol und Pivalyl) und Geschlecht der Tiere (bei weiblichen Küken 1 : 10,4).

CHARLES und HUSTON (1970) pelletierten eine mit 0,2 % Sulfaquinoxalin ergänzte Mais-Soja-Ration, der jeweils eines von sieben verschiedenen handelsüblichen Menadion-Präparaten (3 MSB, 3 MSBC, 1 MPB) eingemischt waren. Nach 15tägiger Lagerdauer ergab sich anhand der Thromboplastinzeiten bereits bei 5 Präparaten ein Vitamin K - Aktivitätsverlust um mehr als 60 %. Nach 30 Tagen wies MPB noch 66 % der ursprünglichen Vitamin K - Aktivität auf. Die MSB- und MSBC-Präparate hatten dagegen zwischen 61 und 90 % ihrer Vitamin K - Aktivität verloren. Abweichend von unseren Versuchsbedingungen wurden hier die Pellets in einer Mischfutter-Fabrik hergestellt, wo die Pellets unter Einwirkung von Heißdampf und sicherlich höherem Druck gepreßt wurden.

Wenn auch die absoluten Zahlen in den referierten Untersuchungen erheblich voneinander abweichen, so ist doch nicht zu übersehen, daß MPB in all diesen Versuchen dem MSBC bzw. MSB in bezug auf Stabilität und Vitamin K - Aktivität überlegen war. Anzumerken ist noch, daß auch die Wahl des Vitamin K - Antagonisten die Relation der Vitamin K - Wirksamkeit zwischen den geprüften Präparaten messbar veränderte.

In jüngster Zeit wurde jedoch durch die Untersuchungen von GRIMM und TIEWS (1972) deutlich, daß der Austausch

von Natrium in MSB durch Pyrimidinol in MPB nicht allein entscheidend für die Stabilität der Präparate ist. In erster Linie scheinen dafür die von den Herstellern angewandten "äußeren" Stabilisierungsverfahren ausschlaggebend zu sein. (siehe auch B., 4.4.).

GRIMM und TIEWS (1972) untersuchten chemisch-analytisch anhand des Menadion-Gehalts die Stabilität von 3 MSB - und 2 MPB - Präparaten vier verschiedener Hersteller über einen Zeitraum von 16 Wochen. In einer Mineralstoffmischung ging der Menadion-Gehalt des einen MPB-Präparates (MPB-1) nach 12 Wochen um 13 %, nach 16 Wochen um 17 % zurück. Für die übrigen Präparate wurde in dieser Zeit ein Menadion-Verlust von nur max. 5 % bestimmt. Eingemischt in ein Eiweißkonzentrat, verloren ein MSB-Präparat (MSB-3) 51 %, die MPB-Präparate 10 bzw. 49 % des ursprünglich vorhandenen Menadion-Gehalts. Die übrigen beiden MSB-Substanzen erwiesen sich als stabil. Die Chargen MSB-1 und MPB-1, die sich im Eiweißkonzentrat am lagerungsbeständigsten verhalten hatten, wurden in Untermischungen einer Pelletierung unterzogen. Nach 16wöchiger Lagerung wurden für MSB-1 14 %, für MPB-1 40 % Menadion-Verlust gemessen.

Mit diesen chemisch-analytischen Daten wird eine Untersuchung vorgelegt, die abweichend von den bisher zitierten, sich allerdings auf biologische Verfahren stützenden Aussagen die bessere Stabilität von MPB gegenüber MSB nicht bestätigt. Deutlich ist aber auch hier geworden, daß zwischen gleich benannten Präparationen erhebliche Unterschiede im Stabilitätsverhalten bestehen, die möglicherweise auf verschiedenen Herstellungsverfahren oder aber, worüber dem Untersucher keine Informationen vorlagen, auf ein unterschiedliches Alter der untersuchten Vitamin-Präparate zurückzuführen sein könnten.

In der Tendenz zumindest wurden die Befunde von GRIMM und TIEWS (1972) durch das vorgelegte Experiment III bestätigt. Auch hier ließ sich kein Hinweis finden, daß MSB in seinen Stabilitätseigenschaften dem MPB von vornherein unterlegen sein muß. Ganz im Gegenteil wiesen die tier-experimentellen Daten einen erheblichen Menadion-Verlust aus, wenn die Menadion-Quelle MPB in Untermischungen pelletiert wurde.

Es darf nicht von der Hand gewiesen werden, daß möglicherweise bestimmte Unterschiede in der Wertbemessung von MPB im Vergleich zu MSB, die gegenüber den zitierten Untersuchungen aufgetreten sind, durch die Wahl eines bisher nicht üblichen Vitamin K - Antagonisten bedingt sind. Es erscheint aber doch weitgehend unwahrscheinlich, daß der Vitamin K - Antagonist Cumatetralyl etwa im Vergleich zu Dicumarol eine Umkehr der Vitamin K - Wirkverhältnisse zwischen MSB und MPB auslösen sollte.

Es kann ebenfalls als unwahrscheinlich angesehen werden, daß der Menadion-Dosierungsbereich, der im biologischen Testverfahren angewandt wird, das Testergebnis maßgeblich beeinflusst. In den eigenen Untersuchungen wurden geringere Menadion-Dosierungen (25 - 100 ppb) eingesetzt als in den zitierten Experimenten nordamerikanischer Autoren (30,59,61, 62,133,145).

Die Möglichkeit einer zufälligen Falschaussage von Versuch III, die sich auf die Auswertung der Thromboplastinzeit stützt, wird nicht in Betracht gezogen. Die Hilfsparameter Mortalität, Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und -verwertung weisen alle dieselbe Tendenz auf wie die Thromboplastinzeit. Letztere läßt sich allerdings mit höherer Genauigkeit und gestützt auf statistische Verfahren auswerten.

Es kann daher hier nur festgestellt werden, daß die vergleichenden Ergebnisse bei Stabilitätsuntersuchung von MSB und MPB zu den anderen bekannten Ergebnissen, die ebenfalls mit biologischen Verfahren gewonnen wurden, in Widerspruch stehen. Überzeugende Gründe hierfür können nicht namhaft gemacht werden.

An dieser Stelle darf noch einmal auf die hohe Genauigkeit des angewandten Testverfahrens hingewiesen werden, die sich in relativ geringen Variations-Koeffizienten von 11 bzw. 23 % der ermittelten Titer (1,14 bzw. 0,50) für den biologisch wirksamen Menadion-Gehalt von MPB in verschiedenen Futtertypen (Mehl und Pellets) ergab.

Letztendlich wurden die Ergebnisse des Kükentests durch die chemisch-analytischen Daten, die aus denselben Futterproben gewonnen wurden, bestätigt, wenn auch mit einer Zeitdifferenz von etwa 100 Tagen. Die chemische Analytik hat daher offensichtlich zu einem Zeitpunkt, zu dem Menadion bereits biologisch nicht mehr als Vitamin K voll wirksam werden konnte, noch Menadion als solches erfaßt und ausgewiesen.

Alternativ könnte auch in Betracht gezogen werden, daß der chemisch-analytisch ausgewiesene Menadion-Gehalt nicht allein für die Vitamin K - Wirkung im Organismus (des Kükens) verantwortlich ist.

Die chemische Menadion-Analytik vermag daher über die Vitamin K - Wirksamkeit eines aufgefundenen Menadion-Gehalts nur eingeschränkte Aussagen zu treffen. Sie kann das biologische Nachweisverfahren bestenfalls ergänzen, nicht aber ersetzen.

6. MSB und MPB als Standardpräparate

Auf die Problematik der Einführung verschiedener Menadion-Abkömmlinge als Standardpräparate wurde unter B., 4.4. bereits hingewiesen.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, sowie die Resulte von GRIMM und TIEWS (1972) können unter diesem Gesichtspunkt wie folgt zusammengefaßt werden:

Weder MSB noch MPB stellen ideale Standardpräparate dar, weil beide in ihrer Vitamin K - Aktivität je nach Hersteller (unterschiedliche Produktionsverfahren (58)) und Behandlung in Untermischungen erheblich und in unterschiedlichem Ausmaß nachlassen können. MSB und MPB dürften nur dann als Standardpräparate in Rationen brauchbar sein, wenn ihre Stabilität stärkeren Belastungen (z.B. durch lange Lagerung, Hitze, Druck oder den Futtertyp, wie Eiweißkonzentrate) nicht ausgesetzt wird.

7. Abschließende Betrachtung

Das in dieser Arbeit beschriebene Testverfahren zur Bestimmung der Vitamin K - Aktivität stellt keine grundsätzlich neue Methode dar. Die Sensitivität des Verfahrens konnte jedoch gegenüber bekannten Methoden (30,39,59,61,62,133,145) deutlich gesteigert werden. Der aufgefundene niedrige Meßbereich (20 - 100 ppb Menadion) hat einige wichtige Vorteile:

hohe Genauigkeit auch bei sehr geringen Menadion-Dosisunterschieden;

Eignung zur Bestimmung des Vitamin K - Gehalts in handelsüblichem Mischfutter (nach Verschneiden mit einer Vitamin K - armen Basalration);

enge Korrelation der Thromboplastinzeit mit den Versuchs-kriterien Gewichtszunahme, Futterverzehr und - verwertung.

Das hier erprobte und vorgestellte Verfahren wird daher als brauchbar angesehen zur Bestimmung des Menadion-Gehaltes in Futtermitteln, welcher der chemischen Analytik nicht mehr zugänglich ist, oder wenn begründetes Interesse an der Auffindung der tatsächlich vorhandenen Vitamin K - Aktivität (z.B. Schadfutter, Haftpflichtfälle) besteht. Dabei sollte allerdings die zu untersuchende Probe in mehreren Versuchsrationen mit unterschiedlichem Menadion-Gehalt eingesetzt werden. Aufgrund der Ergebnisse der Versuche II und III wird für künftige Untersuchungen eine Menadion-Dosierungsreihe von 0, 30, 60 und 120 ppb vorgeschlagen.

Die Thromboplastinzeit bei fehlender Menadion-Versorgung wies eine erhebliche Standardabweichung auf. Ein geringfügiges Auseinanderziehen der Testpunkte (Menadion-Dosierungen) gegenüber Versuch III (25, 50 und 100 ppb) erscheint daher vorteilhaft, zumal durch die höchste Menadion-Dosierung von 120 ppb der lineare Dosierungsbereich nicht gestört und die Steilheit der Regressionsgeraden nicht beeinträchtigt werden dürfte, wie aus einem Vergleich der entsprechenden "Standardgeraden" von Versuch II und III geschlossen wird.

Schließlich dürfte das Verfahren auch zur Testung neuer Menadion-Derivate hervorragend geeignet sein, da hier das Fehlen einer ausreichend standardisierten Bezugssubstanz (siehe auch D., 6.) weniger ins Gewicht fällt und handelsübliche Präparationen zum Vergleich herangezogen werden können, ohne daß ein Verlust an hier interessierender Aussagefähigkeit zu befürchten wäre.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Den eigenen Untersuchungen wird eine Darstellung der vorliegenden Kenntnisse über die physiologische Bedeutung von Vitamin K, seinen Stoffwechsel und seine Provitamine sowie Vitamin K - Antagonisten vorangestellt.

In 3 Versuchen an insgesamt 1584 Küken (B 975, ♂) wurde ein Verfahren zum biologischen Nachweis kleinster Menadion-Mengen im Futter entwickelt und geprüft. Als Standardsubstanz diente in Versuch I und II Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit (MPB), in Versuch III wurde MPB mit Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB) hinsichtlich seiner Futterstabilität verglichen. Zur Sensibilisierung der Versuchsparameter wurde der Vitamin K - Antagonist Cumatetralyl (CT) in Dosierungen von 5 - 20 ppm der Vitamin K - armen Basalration (methionin-ergänzte Mais-Maisstärke- Sojaschrot- Mischung) zugesetzt. Als Versuchs-kriterien wurden neben der Thromboplastinzeit (mit homologem Thromboplastin bestimmt) Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und -verwertung sowie die Verlustrate herangezogen.

Ergebnisse:

- 1.) Zwischen Thromboplastinzeit und dem Menadion-Gehalt der Futtermischung (mit 20 ppm CT) bestand in Versuch I bei (33 Tage depletierten) Küken eine signifikante Beziehung ($y = 100,7(10^{-2}x+0,1)^{-0,26}$, $P < 0,001$) über den gesamten Menadion-Dosierungsbereich (0, 125, 250, 500, 1000 und 2000 ppb).
- 2.) Bei allen verwendeten Versuchs-kriterien bestanden die deutlichsten Unterschiede zwischen den Menadion-Konzentrationen 0 und 125 ppb.

- 3.) Von 5 über 10 bis 15 ppm ansteigende CT-Konzentrationen im Futter bewirkten eine zunehmende Empfindlichkeit der Versuchskriterien. 20 ppm CT verursachten im niedrigen Menadion-Dosierungsbereich (0 - 125 ppb) bereits eine erhebliche, aus versuchstechnischen Gründen unerwünschte Wachstumsdepression.
- 4.) In Versuch II konnte für die Menadion-Dosierungsreihe 0, 30, 60, 90 und 120 ppb (bei 15 ppm CT im Futter) eine lineare Beziehung zwischen Thromboplastinzeit und Menadion-Gehalt der Basalration nachgewiesen werden ($y = 162,3 - 0,72 x$, $P < 0,001$).
- 5.) Der (anfänglich unbekannte) Menadion-Gehalt einer Futterprobe konnte durch Verschneiden mit der Vitamin K - armen Basalration und anschließender Verfütterung in Versuch II sicher bestimmt werden (Sollgehalt der Futterprobe: 1,2 ppm, tier-experimentell ermittelter Gehalt: 1,26 ppm Menadion).
- 6.) In Versuch III (25, 50 und 100 ppb Menadion) konnte gezeigt werden, daß unabhängig von einer 64tägigen Futterlagerung zwischen MSB und MPB keine Unterschiede bezogen auf die Vitamin K - Aktivität ihres jeweiligen Menadion-Anteils bestehen, wenn die Futterproben keiner weiteren Behandlung unterzogen werden.
- 7.) Die Stabilität und biologische Vitamin K - Wirksamkeit von Menadion aus MSB erlitt durch Pelletieren keine Einbuße.
- 8.) Die Vitamin K - Aktivität von MPB-Menadion einer pelletierten Futterprobe konnte im Vergleich zu MSB (unbehandelt und pelletiert) mit $50 \% \pm 12 \%$ (Standardabweichung) ermittelt werden.

- 9.) In allen 3 Versuchen bestanden enge Beziehungen zwischen Thromboplastinzeit und den anderen Versuchs-kriterien Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und -verwertung sowie Mortalitätsrate. Die aus den Thromboplastinzeiten gewonnenen Schlußfolgerungen wurden daher durch die anderen Versuchsparameter wirkungsvoll abgestützt.

Das erprobte Verfahren zur Bestimmung der Vitamin K - Aktivität von Menadion erscheint brauchbar für die Untersuchung von Futtermitteln sowie Vergleiche zwischen verschiedenen Vitamin K - wirksamen Substanzen. Wie Gegenüberstellungen mit chemisch-analytisch ermittelten Menadion-Gehalten an identischen Futterproben ergaben, muß unter Umständen bereits zu einem Zeitpunkt, zu dem das chemische Verfahren den Sollgehalt an Menadion noch innerhalb der analytisch-bedingten Fehlergrenzen ausweist, mit einem Aktivitätsverlust von 50 % gerechnet werden. Dieser Befund unterstreicht die generelle Bedeutung biologischer Vitamin - Bestimmungsverfahren.

E.1. SUMMARY

A review of the present knowledge concerning the physiological means of vitamin K, its metabolism, provitamins and antagonists is given.

In 3 experiments on a total of 1584 male broiler chicks a bioassay for the determination of small menadione-quantities was tested. Menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (MPB) was the standard substance in trials I and II. In trial III menadione sodium bisulfite (MSB) was compared with MPB concerning to their stability in diets. The vitamin K - antagonist cumatetralyl (CT) dosed from 5 - 20 ppm was added to the (methionine-supplemented corn-cornstarch- soy) basal diet low in vitamin K content to increase the sensibility of the experimental parameters. The mean test criterion was the thromboplastin time (carried out with homologous thromboplastin). Growth rate, feed consumption, feed efficiency and mortality served as additional parameters.

Results:

- 1.) In experiment I the diets contained 20 ppm CT and 0, 125, 250, 500, 1000 and 2000 ppb menadione respectively. A significant correlation ($y = 100.7(10^{-2}x+0.1)^{-0.26}$, $P < 0.001$) could be demonstrated between thromboplastin time and the dietary menadione of chicks depleted for 33 days.
- 2.) 0 and 125 ppb added menadione led to the most remarkable differences in all experimental criterions used.

- 3.) Increasing dietary CT-concentrations (5, 10, 15 ppm) effected an improved sensibility of the trial criterions. 20 ppm CT in combination with a low menadione level caused a marked growth depression reducing the number of animals available for test purposes.
- 4.) In trial II a linear relationship between dietary menadione (0, 30, 60, 90 and 120 ppb) and thrombo-plastin time has been proved ($y = 162.3 - 0.72 x$, $P < 0.001$).
- 5.) A feed with 1.2 ppm added menadione (the level was not known to the experimentator) was tested by blending with the vitamin K low basal diet. Applying the bioassay a value of 1.26 ppm was found.
- 6.) In experiment III a feed mixture was supplemented with MSB and MPB respectively. The feed samples were stored for 64 days as meal type and pelleted diet respectively. The storage had no influence on the vitamin K activity of MSB and MPB. MSB and MPB were equal biologically effective on a menadione basis.
- 7.) The vitamin K activity of MSB was not influenced by pelleting.
- 8.) The vitamin K activity of menadione from pelleted MPB samples was estimated only with $50 \% \pm 12 \%$ in comparison with menadione from both MSB samples.

- 9.) In all 3 experiments thromboplastin time was closely related with growth rate, feed consumption, feed efficiency and mortality. The conclusions based on thromboplastin time were well supported by the other experimental criterions.

The bioassay described before to test the vitamin K activity of menadione seems to be able to determine the vitamin K level of feedstuffs and to compare various vitamin K active substances.

At the same time, only 50 % of the original menadione were biologically active in a test sample for which a loss of menadione could not be proved by chemical methods.

These findings stress the importance of vitamin bioassays.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALMQUIST, H.J.;
Vitamin K.
Physiol. Rev. 21, 194-216 (1941)
2. ALMQUIST, H.J., A.A. KLOSE;
J. Am. Chem. Soc. 61, 2557 (1939 a)
zitiert nach DAM, H. (36).
3. ALMQUIST, H.J., A.A. KLOSE;
Determination of the anti-hemorrhagic vitamin.
Biochem. J. 33, 1055-1960 (1939 b)
4. ALMQUIST, H.J., C.F. PENTLER, E. MECCHI;
Synthesis of the antihemorrhagic vitamin
by bacteria.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 38, 336 (1938)
5. ALMQUIST, H.J., E.L.R. STOCKSTAD;
Hemorrhagic chick disease of dietary origin.
J. Biol. Chem. 111, 105-113 (1935)
6. ANDERSON, G.F., M.J. BARNHART;
Prothrombin synthesis in the dog.
Am.J.Physiol. 206, 929-938 (1964)
7. ANDERSON, G.C., J.H. HARE, J.K. BLETNER, C.E. WEAKLEY, jr.,
J.A. MASON;
A hemorrhagic condition in chicks fed
simplified rations.
Poultry Sci. 33, 120-126 (1954)
8. ANDERSON, G.W., W.B. SCANDRETT, G.C. ASHTON, J.R. COUCH;
Further studies on coliforms as related to the
hemorrhagic syndrome in chicks.
Poultry Sci. 41, 278-284 (1962)

9. ANDERSON, G.W., S.J. SLINGER, J.R. COUCH;
Coliforms as related to the hemorrhagic syndrome.
Poultry Sci. 35, 933-936 (1956)
10. ANDERSON, W.W., R.D. DALIAM;
The effect of vitamin K₁ on oxydative phosphorylation of rat liver mitochondria irradiated with ultraviolet light.
J.Biol.Chem. 234, 409-411 (1959)
11. ANDRUS, W.D., J.W. LORD jr., R.A. MOORE;
The effect of hepatectomy on the plasma prothrombin and the utilization of vitamin K.
Surgery 6, 899-900 (1939)
12. ANSBACHER, S., E. FERNHOLZ;
Simple compounds with vitamin K activity.
J.Amer.Chem.Soc. 61, 1924-1925 (1939)
13. ASANO, A., A.F. BRODIE, A.F. WAGNER, P.E. WITTREICH, K.FOLKERS;
ATP biosynthesis from the oxidation of synthetic chromanyl phosphate of K₁.
Fed.Proc. 21, 54 (1962 a)
14. ASANO, A., A.F. BRODIE, A.F. WAGNER, P.E. WITTREICH, K.FOLKERS;
The new synthetic 6-chromanyl phosphate of vitamin K₁ (20) and its behaviour in an enzymatic system from Mycobacterium phlei.
J.Biol.Chem. 237, 2411-2412 (1962 b)
15. BARNHART, M.I.;
Cellular site for prothrombin synthesis.
Am.J.Physiol. 199, (2) 360-366 (1960)
16. BAUMEISTER, M.;
Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-Bestimmung.
med.vet. Diss. München (1973)

17. BELL, R.G., J.T. MATSCHINER;
Synthesis and destruction of prothrombin in the rat.
Arch.Biochem.Biophys. 135, 152-159 (1969)
18. BELL, R.G., J.A. SADOWSKY, J.T. MATSCHINER;
Mechanism of action of warfarin.
Warfarin and Metabolism of vitamin K₁.
Biochemistry 11, 1959-1961 (1972)
19. BEYER, R.E.;
The effect of ultraviolet light on mitochondria.
II. Restoration of oxydative phosphorylation
with vitamin K₁ after near-ultraviolet treatment.
J.Biol.Chem. 234, 688 - 692 (1959)
20. BEYER, R.E., R.D. KENNISON;
Relationship between prothrombin and oxydative
phosphorylation in chick liver mitochondria.
Arch.Biochem.Biophys. 84, 63-70 (1959)
21. BIGGS, R., R.G. MACFARLANE;
Human blood coagulation and its disorders.
Blackwell Scientific Publications, Oxford 3rd ed(1962)
22. BILLETER, M., C. MARTIUS;
Über die Umwandlung von Phyllochinon (Vitamin K₁)
in Vitamin K₂ im Tierkörper.
Biochem. Zeitschrift 333, 430-439 (1960)
23. BINKLEY, S.B., R.W. McKEE, S.A. THAYER, E.A. DOISY;
The constitution of vitamin K₂.
J.Biol.Chem. 133, 721-729 (1940)
24. BLACK, S., R.S. OVERMANN, C.A. ELVEHJEM, K.P. LINK;
The effect of sulfaguanidine on rat growth and
plasma prothrombin.
J.Biol.Chem. 145, 137-143 (1942)

25. BRINKHOUS, K.M.;
Plasma prothrombin: Vitamin K.
Medicine 19, 329-416 (1940)
26. BRODIE, A.F.;
Vitamin K and other quinones as coenzymes in
oxydative phosphorylation in bacterial systems.
Fed.Proc. 20, 995-1004 (1961)
27. CAMPBELL, A.H., K.P. LINK;
Studies on the hemorrhagic sweet clover disease.
IV. The isolation and crystallisation of the
hemorrhagic agent.
J.Biol.Chem. 138, 21-33 (1941)
28. CAVALLI-SFORZA, L.;
Biometrie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2. Auflage (1969)
29. CHANDRASEKHAR, N., R.A. HICKIE, G.J. MILLAR;
The effect of dicumarol on prothrombin time
in rats and its relation to vitamin K content
of liver.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 43, 639-647 (1965)
30. CHARLES, O.W., B.C. DILWORTH, E.J. DAY;
Chick bioassay of vitamin K compounds using
dicumarol and pivalyl as anticoagulants.
Poultry Sci. 47, 754-760 (1968)
31. CHARLES, O.W., T.M. HUSTON;
Stability studies of vitamin K materials
subjected to pelleting and storage.
The world poultry congress, Sept. 1970

32. CLARK, V.M., D.W. HUTCHINSON, G.W. KIRBY, Sir A. TODD;
J.Chem.Soc. 715-721 (1961)
zitiert nach LEDERER, E., M. VILKAS (95).
33. CLARK, V.M., Sir A. TODD;
Ciba Found.Symp.Quinones Electron Transport
190-204 (1961)
zitiert nach LEDERER, E., M. VILKAS (95).
34. DAM, H.;
Über die Cholesterinsynthese im Tierkörper.
Biochem. Zeitschrift 220, 158-162 (1930)
35. DAM, H.;
The antihemorrhagic vitamin of the chick.
Nature 135, 652-653 (1935)
36. DAM, H.;
Summary and prospects;
aus: Vitamins and Hormones, Vol. 24, S. 682
Herausgeb.: R.S. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine
Academic Press New York and London(1966)
37. DAM, H., A. GEIGER, J. GLAVIND, P. KARRER, W. KARRER,
E. ROTHSCHILD, H. SALOMON;
Isolierung des Vitamin K in hochgereinigter Form.
Helv. Chim. Acta 22, 310-313 (1939)
38. DAM, H., J. GLAVIND;
Determination of vitamin K by the curative
blood-clotting method.
Biochem. J. 32, 1018-1023 (1938)
39. DAM, H., J. KRUSE, E. SØNDERGAARD;
Determination of vitamin K by the curative
technique in chicks.
Acta Phys. Scand. 22, 238-245 (1950)

40. DAM, H., I. PRANGE, E. SØNDERGAARD;
Levels of vitamin K₁ in blood and various organs
of chicks and rats after administration of
massive dosis.
Acta Pharmacol.Toxicol. 10, 58-68 (1954)
41. DAM, H., I. PRANGE, E. SØNDERGAARD;
Deposition of injected massive doses of colloidal
vitamin K₁ in chicks, after partial blockage of
the reticula-endothelial system and in pregnant rats.
Acta Pharmacol.Toxicol. 11, 90-93 (1955)
42. DAM, H., E. SØNDERGAARD;
Comparison of the action of vitamin K₁, menadione
and synkavit administered intravenously to
vitamin K deficient chicks.
Acta Pharmacol.Toxicol. 9, 131-136 (1953)
43. DAY, E.J.;
Evaluation of a new vitamin K compound.
Proc. of Texas Nutrition Conference 11/12,
32-40 (1967)
44. DAY, E.J., R.C. WOODY, B.C. DILWORTH;
Stability of menadione sodium bisulfite complex
in premixes and a comparison of a chemical and
a biological assay.
Feedstuffs 36, 50-56 (Aug. 15, 1964)
45. DEUTSCH, E.;
Blutgerinnungsfaktoren.
E. Deuticke Verlag Wien (1955)
46. DEUTSCH, E.;
Vitamin K in medical practice : adults.
aus: Vitamins and Hormones, Vol. 24, S. 665-680
Herausgeb.: R.S. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine
Academic Press New York and London (1966)

47. DIALAMEH, G.H., W.V. TAGGART, J.T. MATSCHINER, R.E. OLSON;
Isolation and characterisation of menaquinone-4
as a product of menadione metabolism in chicks
and rats.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 41, 391-400 (1971)
48. DIDISHEIM, P., K. HATTORI, J.H. LEWIS;
Hematologie and coagulation in various animal
species.
J.Lab.Clin.Med. 53, 866 (1959)
49. DORN, P.;;
Zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung
beim Huhn.
med.vet.Habil. München (1965)
50. DOUGLAS, A.S.;;
Some observations on the coagulation defect
in vitamin K deficiency.
J.Clin.Path. 11, 261 (1958)
51. DUA, P.N., E.J. DAY;
Vitamin K activity of menadione dimethylpyrimidinol
bisulfite in chicks.
Poultry Sci. 45, 94-96 (1966)
52. DUELLO, T.J., J.T. MATSCHINER;
The relationship between the storage forms of
vitamin K and dietary phylloquinone in the dog.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 41, 180-188 (1971)
53. EDENS, F.W., H.P. vanKREY, M. KELLY, P.B. SIEGEL;
Menadione requirements of chickens selected
for prothrombin time.
Poultry Sci. 49, 295-297 (1970)

54. FIESER, L.F.;
Synthesis of 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone.
J.Am.Chem.Soc. 61, 2559-2561 (1939 a)
55. FIESER, L.F.;
Synthesis of vitamin K₁.
J.Am.Chem.Soc. 61, 3467 (1939 b)
56. FINKEL, M.J.;
Vitamin K₁ and the vitamin K analogues.
Clin.Pharmacol.Therap. 2, 794-814 (1961)
57. FISCHER, A.;
Ein neuer Blutgerinnungsapparat.
Pflüg.Arch.ges.Physiol. 225, 737-739 (1930)
58. FRAGNER, J;
Vitamin K-Gruppe. III.Chemie, S. 1039-1064
Verf.: J. Weichet; aus: Vitamine, Bd. II
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1965)
59. FROST, D.V., H.S. PERDUE, H.C. SPRUTH;
Vitamin K activity of menadione sodium bisulfite
in chickens.
J.Nutr. 59, 181-196 (1956)
60. GRIMINGER, P.;
On the vitamin K requirement of turkey poults.
Poultry Sci. 36, 1227-1235 (1957)
61. GRIMINGER, P.;
Prothrombin bioassay for vitamin K with different
thromboplastin preparations.
Int.Zeitschrift f. Vitaminforschung 32, 405-412 (1962)
62. GRIMINGER, P.;
Vitamin K activity in chickens : Phylloquinone and
menadione in the presence of stressagents.
J.Nutr. 87, 337-343 (1965 a)

63. GRIMINGER, P.;
Relative vitamin K potency of two watersoluble
menadione analogues.
Poultry Sci. 44, 210-213 (1965 b)
64. GRIMINGER, P.;
Biological activity of the various vitamin K forms.
aus: Vitamins and Hormones, Vol. 24, S. 605-618
Herausgeb.: R.S. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine
Academic Press New York and London (1966)
65. GRIMINGER, P., G. BRUBACHER;
The transfer of vitamin K₁ and menadione from the
hen to the egg.
Poultry Sci. 45, 512-519 (1966)
66. GRIMINGER, P., O. DONIS;
Potency of vitamin K₁ and two analogues in
counteracting the effect of dicumarol and
sulfaquinoxalin in the chick.
J.Nutr. 70, 361-368 (1960)
67. GRIMINGER, P., Y.S. SHUM, P. BUDOWSKY;
Effect of dietary vitamin K on avian brain
thromboplastin activity.
Poultry Sci. 49, 1681-1686 (1970)
68. GRIMM, L., J. TIEWS;
Untersuchungen zur Stabilität verschiedener
Vitamin K - Präparationen im Mischfutter.
28 / II. Sonderheft zur Zeitschrift "Land-
wirtschaftliche Forschung", 159-163 (1972)
69. HAMILTON, J.W., R.D. DALLAM;
Isolation of vitamin K from animal tissue.
Arch.Biochem.Biophys. 123, 514-530 (1968)

70. HARMS, R.H., F.R. TARVER jr.;
The influence of dicumarol upon bloodclotting
time and blood loss of young chickens.
Poultry Sci. 36, 76-79 (1957)
71. HARTERT, H., H.G. LASCH, J. PFISTER;
Charakterisierung und Funktion eines Retraktions-
Cofaktors.
Thromb.Diath.Haemorrh. 1, 445-458 (1957)
72. HEMKER, H.C.;
unveröffentlicht (1966)
zitiert nach DEUTSCH, E. (46)
73. HEMKER, H.C., A.D. MULLER;
Kinetic aspects of the bloodclotting enzymes.
VI. Localisation of the site of blood-coagulation
inhibition by the protein induced by vitamin K
absence (PIVKA).
Thromb.Diath.Haemorrh. 20, 78-87 (1968)
74. HEMKER, H.C., A.D. MULLER, E.A. LÖELIGER;
Thromb.Diath.Haemorrh. 23, 633 (1970)
zitiert nach SUTTIE (166).
75. HEMKER, H.C., J.J. VELTKAMP, E.A. LÖELIGER;
Kinetic Aspects of the interaction of bloodclotting
enzymes. III. Demonstration of an inhibitor of
prothrombin conversion in vitamin K deficiency.
Thromb.Diath.Haemorrh. 19, 346-363 (1968)
76. HENNE, H.,;
Untersuchungen über die II. Blutgerinnungsphase
des Huhns.
med.vet. Diss. München (1967)

77. HEWLETT, A.W.;
Über die Einwirkung des Peptonblutes auf Haemolyse
und Baktericidie. Bemerkungen über die Gerinnung
des Blutes.
Arch.exp.Path.Pharmakol. 49, 307 (1903)
78. HILL, R.B., S. GAETANI, A.M. PAOLUCCI, P.B. RAMARAO,
R. ALDEN, G.S. RANHOTRA;
Vitamin K and biosynthesis of protein and prothrombin.
J.Biol.Chem. 243, 3930-3939 (1968)
79. HORTH, C.E., D.McHALE, L.R. JEFFRIES, S.A. PRICE,
A.T. DIPLOCK, J. GREEN;
Vitamin K and oxydative phosphorylation.
Biochem.J. 100, 424-429 (1966)
80. ISLER, O., O. WISS;
Chemistry and Biochemistry of the K vitamins.
aus: Vitamins and Hormones, Vol. 17, S. 53-90
Herausgeb.: R.S. Harris, G.F. Marrian, K.V. Thimann
Academic Press New York and London (1959)
81. IUPAC-IUB-Tentative Rules;
Nomenclature of quinones with isoprenoid side chains.
J.Biol.Biochem. 10, 2989-2991 (1966)
82. JAENECKE, J.;
Antikoagulantien- und Fibrinolysetherapie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
83. JOCHIMS, R.;
Das hämorrhagische Syndrom beim Huhn.
med.vet. Diss. Hannover (1962)
84. JOHNSON, H.V., C. BOYD, J. MARTINOVIC, G. VALKOVIC,
B.C. JOHNSON;
A new blood protein which increases with vitamin K
deficiency.
Arch.Biochem. 148, 431-442 (1972)

85. JOHNSON, H.V., J. MARTINOVIC, B.C. JOHNSON;
Vitamin K and the biosynthesis of the
glycoprotein prothrombin.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 43, 1040-1048 (1971)
86. JOHNSTON, M.F.M., R.E. OLSON;
Studies of prothrombin biosynthesis in cell-free
systems.
II. Incorporation of L - (U - ^{14}C) leucine
into prothrombin by rat liver microsomes and
ribosomes.
J.Biol.Chem. 247, 3994-4000 (1972 a)
87. JOHNSTON, M.F.M., R.E. OLSON;
Studies of prothrombin biosynthesis in cell-free
systems.
III. Regulation by vitamin K and warfarin of
prothrombin biosynthesis in rat liver microsomes.
J.Biol.Chem. 247, 4001-4007 (1972 b)
88. JOSSO, F., J.M. LAVERGNE, M. GOUAULT, O. PROU-WARTELLE,
J.P. SOULIER;
Différents états moléculaires du facteur II
(prothrombine). Leur étude à l' aide de la
staphylocoagulase et d' anticorps anti-facteur II.
Le facteur II chez les sujets traités par les
antagonistes de la vitamine K.
Thromb.Diath.Haemorrh. 20, 88-98 (1968)
89. JÜRGENS, R. ;
Wirkung von Vitamin K₂ auf die Dicumarol-
hypoprothrombinämie und die Acceleratorfaktoren
am lebergeschädigten Kaninchen und nach Leber-
extirpation bei der Katze.
Acta haemat. 7, 143-156 (1952)

90. JÜRGENS, J., F.K. BELLER;
Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1959)
91. KARRER, P., A. GEIGER, A. RÜEGGER, H. SALOMON;
Über Nor - α - phyllochinon (Nor - Vitamin - K₁)
und ähnliche Verbindungen.
Helv. Chim. Acta 22, 1513-1516 (1939)
92. KAZMIER, F.J., J.A. SPITTELL jr., J.H. THOMPSON jr.,
C.A. OWEN jr.;
Effect of oral anticoagulants on factors
VII, IX, X and II.
Arch. Internal Med. 115, 667-673 (1965)
93. KIPFER, R.K., R.E. OLSON;
Reversal by vitamin K of cycloheximid inhibited
biosynthesis of prothrombin in the isolated
perfused rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 1041-1048 (1970)
94. KORNBERG, A., F.S. DAFT, W.H. SEBRELL;
Production of vitamin K deficiency in rats by
various sulfonamids.
Public Health Reports 59, 832-844 (1954)
95. LEDERER, E., M. VILKAS;
Phosphorylation of derivatives of the vitamin K group.
aus: Vitamin and Hormones, Vol. 24, S. 409-426
Herausgeb.: R.S. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine
Academic Press New York and London (1966)
96. LEV, M., A.W. MILFORD;
Water-soluble factors with vitamin K activity
from pig liver and from Fusiformis nigrescens.
Nature 210, 1120-1122 (1966)

97. LEV., M., A.F. MILFORD;
Fed.Proc. 26, 698 (1967)
zitiert nach WEBER, F., O. WISS (175).
98. LI, L.F., R.K. KIPFER, R.E. OLSON;
Immunochemical measurement of vitamin K - induced
biosynthesis of prothrombin in the isolated
perfused rat liver.
Arch.Biochem.Biophys. 137, 494-499 (1970)
99. LICHTENTHALER, H.K.;
Verbreitung und relative Konzentration der
Vitamine K₁ und K₂ und ihrer Isoprenologen.
Planta 81, 140-152 (1968 a)
100. LICHTENTHALER, H.K.;
Die Verbreitung der lipophilen Plastidenquinone
in nicht-grünen Pflanzengeweben.
Z.Pflanzenphysiol. 59, 195-210 (1968 b)
101. LICHTENTHALER, H.K., M. TEVINI;
Die Verteilung der Pigmente, Plastidenchinone
und Plastoglobuli auf verschiedene aus beschallten
Spinatchloroblasten gewonnene Partikelfraktionen.
Z.Pflanzenphysiol. 61, 33-50 (1970)
102. LOEB, L.;
Versuche über einige Bedingungen der Blutgerinnung,
insbesondere über die Spezifität der in den Ge-
weben vorhandenen Coaguline.
Virchows Arch. 176, 10 (1904)
103. LOELIGER, A.E., A. HENSEN, B. van der ESCH;
Erkrankungen mit Mangel an Faktor II, VII, IX und X.
6. Hamburger Symposium über Blutgerinnung
Thromb.Diath.Haemorrh. 48-54 (1961)

104. LOWENTHAL, J., J.A. MACFARLANE;
The relation between structure and activity of
compounds with vitamin K - like activity.
Biochem.Pharmacol. 8, 145 (1961)
105. LOWENTHAL, J., E.L. SIMMONS;
Failure of actinomycin D to inhibit appearance
of clotting activity by vitamin K in vitro.
Experientia 23, 421-422 (1967)
106. LOWENTHAL, J., J.D. TAYLOR;
A method for measuring the activity of compounds
with an activity like vitamin K against indirect
anticoagulants in rats.
Brit.J.Pharmacol.Chemotherap. 14, 14 (1959)
107. LYONS, R.N.;
Thiol-vitamin K mechanism in the clotting
of fibrinogen.
Nature 155, 633-634 (1945)
108. MACCORQUODALE, D.W., L.C. CHENEY, S.B. BINKLEY, W.F. HOLCOMB,
R.W. MCKEE, S.A. THAYER, E.A. DOISY;
The constitution and synthesis of vitamin K₁.
J.Biol.Chem. 131, 357-370 (1939 a)
109. MACCORQUODALE, D.W., R.W.MCKEE, S.B. BINKLEY, L.C. CHENEY,
W.F. HOLCOMB, S.A. THAYER, E.A. DOISY;
Identification of vitamin K₁ (alfalfa).
J.Biol.Chem. 130, 433 (1939 b)
110. MARTIUS, C.;
Proc. 19 th Internat.Congr.Physiol.Montreal
Abstr. Commun. p. 594 (1953)

111. MARTIUS, C.;
Über die intracelluläre Verteilung des Vitamin K
in verschiedenen Organen des Huhns.
Biochem. Zeitschrift 327, 407-409 (1956)
112. MARTIUS, C., H.O. ESSER;
Über die Konstitution des im Tierkörper aus
Methylnaphthochinon gebildeten K - Vitamins.
Biochem. Zeitschrift 331, 1-9 (1958)
113. MARTIUS, C., D. NITZ-LITZOW;
Über den Wirkungsmechanismus des Dicumarols
und verwandter Verbindungen.
Biochim.Biophys.Acta 12, 134-140 (1953)
114. MARTIUS, C., D. NITZ-LITZOW;
Oxydative Phosphorylierung und Vitamin K - Mangel.
Biochim.Biophys. Acta 13, 152-153 (1954)
115. MARTIUS, C., D. NITZ-LITZOW;
Über den Nachweis einer Wirkung von Vitamin K₁ in
vitro auf die oxydative Phosphorylierung.
Biochim.Biophys. Acta 13, 289-290 (1954)
116. MARTIUS, C., E.G. SEMADINI, C. ALVINO;
Über die Umwandlung von Methylnaphthochinon
im Organismus von Wirbellosen.
Biochem. Zeitschrift 342, 492-494 (1965)
117. MATIS, P., U. KNORR;
Die thromboembolischen Erkrankungen.
In Naegele-Matis Stuttgart Schattauer Verlag (1955)
118. MATSCHINER, J.T.;
Occurence and biopotency of various forms of
vitamin K.
aus: The Fat Soluble Vitamins, S. 377-397
Herausgeb. H.F. De Luca, J.W. Suttie
University of Wisconsin Press (1970)

119. MATSCHINER, J.T.;
Characterisation of vitamin K from the content
of bovine rumen.
J. Nutr. 100, 190-192 (1970 a)
120. MATSCHINER, J.T., J.M. AMELOTI;
Characterisation of vitamin K from bovine liver.
J.Lipid.Res. 9, 176 (1968)
121. MATSCHINER, J.T., E.A. DOISY jr.;
Bioassay of vitamin K in chicks.
J. Nutr. 90, 97-100 (1966)
122. MATSCHINER, J.T., W.V. TAGGART;
Bioassay of vitamin K by intracardial injection
in deficient adult male rats.
J. Nutr. 94, 57-59 (1968)
123. McKEE, R.W., S.B. BINKLEY, D.W. MACCORQUODALE, S.A. THAYER,
E.A. DOISY;
The isolation of vitamins K₁ and K₂.
J.Am.Chem.Soc. 61, 1295 (1939)
124. MENOTTI, A.R.;
Ind.Engng.Chem.analyt.Edit. 14, 418 (1942),
zitiert nach GRIMM, L., J. TIEWS (68)
125. MILLAR, G.J., M. HENRIET, L.B. JAKES;
Antagonistic and antidotal action of vitamin K₁
and K₃ versus dicumarol in dogs.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 119, 1093-1097 (1965)
126. MILLER, R., W.P. HARVEY, C.A. FINCH;
Antagonism of dicumarol by vitamin K preparations.
New England J.Med. 242, 211-215 (1950)

127. MUSHETT, C.W., O.A. SEELER;
Hypoprote thrombinemia resulting from the
administration of sulfaquinoxaline.
J.Pharmacol.Exp.Therap. 91, 84-91 (1947)
128. MUSHETT, C.W., F.W. WASHKO;
Some observations in hemorrhagic disorders.
Poultry Sci. 34, 1213 (1955)
129. NATIONAL RESEARCH COUNCIL;
Nutrient Requirements of Poultry.
National Academy of Sciences - National Research
Council
Fifth revised Edition p. 3 (1966) Publ.-No. 1345
130. NELSESTUEN, G.L., J.W. SUTTIE;
The purification and properties of an abnormal
prothrombin protein induced by dicumarol-treated
cows. (A comparison to normal prothrombin).
J.Biol.Chem. 247, 8176-8182 (1972 a)
131. NELSESTUEN, G.L., J.W. SUTTIE;
Biochemistry 11, 4961 (1972 b)
zitiert nach SUTTIE, J.W. (1966).
132. NELSON, T.S., L.C. NORRIS;
Factors affecting the vitamin K requirement
of the chick.
Poultry Sci. 38, 1094-1102 (1959)
133. NELSON, T.S., L.C. NORRIS;
Studies on the vitamin K requirement of the chick.
I. Requirements of the chick for vitamin K₁,
menadione and menadione sodium bisulfite.
J.Nutr. 72, 137-144 (1960)

134. NELSON, T.S., L.C. NORRIS;
Studies on the vitamin K requirement of the chick.
The effect of age and cecectomy on the vitamin K
requirement of the chick.
Poultry Sci. 40, 392 - 395 (1961 a)
135. NELSON, T.S., L.C. NORRIS;
Studies on the vitamin K requirement of the chick.
II. Effect of sulfaquinoxaline on the quantitative
requirements of the chick for vitamin K₁, menadione
and menadione sodium bisulfite.
J.Nutr. 73, 135-142 (1961 b)
136. NICOLA, P. de;
Beitrag zur Charakterisierung des Faktors VII.
Schweiz.Med.Wschr. 83, 1047-1048 (1953)
137. OLSON, R.E.;
Vitamin K induced prothrombin formation:
antagonism by actinomycin.
Science 145, 926-928 (1964)
138. OLSON, R.E.;
Studies on the mode of action of vitamin K.
Advan.Enzyme Regul. 4, 181-196 (1966)
139. OLSON, R.E., R.K. KIPFER, L.F. LI;
Vitamin K - induced biosynthesis of prothrombin
in the isolated perfused rat liver.
Advan.Enzyme Regul. 7, 83-94 (1969)
140. OLSON, R.E., L.F. LI, G. PHILIPPS, R.K. KIPFER;
The mode of action of vitamin K in stimulating
prothrombin synthesis.
Thromb.Diath.Haemorrh. 19, 611-612 (1968)

141. ORLA-JENSEN, S., A.D. ORLA-JENSEN, H. DAM, J. GLAVIND;
Über die K - Vitaminbildung einiger Darmbakterien.
Zentr.Bakteriol.Parasitenk. Abt. II 104,
202 (1941/42)
142. PAKOSTA, R.;
Untersuchungen über die II. Phase der Blutgerinnung am Dicumarol-belasteten Huhn mit homologen Reagenzien.
med.vet. Diss. München (1970)
143. PAOLUCCI, A.M., P.B.R. RAO, B.C. JOHNSON;
Vitamin K deficiency and oxidative phosphorylation.
J.Nutr. 81, 17-22 (1963)
144. PARMAR, S.S., J. LOWENTHAL;
Vitamin K deficiency and oxidative phosphorylation.
Fed.Proc. 20, 51 (1961)
145. PERDUE, H.S., H.C. SPRUTH, D.V. FROST;
Comparison of vitamin K activities of vitamin K₁ and Klotogen (menadione sodium bisulfite complex).
Poultry Sci. 36, 633-635 (1957)
146. PEREIRA, M., D. COURI;
Studies on the site of action of dicumarol on prothrombin biosynthesis.
Biochim.Biophys. Acta 237, 348-355 (1971)
147. PERLIK, E.;
Antikoagulantien.
Edition Leipzig (1964)
148. QUICK, A.J.;
Prothrombin in hemophilic and in obstructive jaundice.
Am.J.Biol.Chem. 109, 73-74 (1935)

149. QUICK, A.J.;
On various properties of thromboplastin.
Am.J.Physiol. 114, 282-296 (1936)
150. QUICK, A.J., G.E. COLLENTINE;
Role of vitamin K in the synthesis of prothrombin.
Am.J.Physiol. 164, 716 (1951)
151. RAY, G.C., N.N. CHAKRAVARTY, S.C. ROY;
Prothrombin and its relation to vitamin K.
Ann.Biochem.Exptl.Med. (Calcutta) 22,
317-328 (1962)
152. RUSSELL, P.J., A.F. BRODIE;
Oxidative phosphorylation in fractioned bacterial
systems. IV. Enzymic formation of reduced
intermediates from vitamin K₁.
Biochim.Biophys.Acta 50, 76-81 (1961)
153. SADEK, S.E., L.E. HANSON, J.O. ALBERTS;
Suspected drug-induced anemias in the chickens.
Am.J.Vet.Med.Ass. 127, 201-203 (1955)
154. SCHØNHEYDER, F.;
The quantitative determination of vitamin K.
Biochem.J. 30, 890-896 (1936)
155. SEEGER, W.H.;
The influence of certain drugs on blood coagulation
and related phenomena.
Pharmacol.Rev. 3, 278-344 (1951)
156. SHAH, D.V., J.W. SUTTIE;
Mechanism of action of vitamin K; evidence for the
conversion of a precursor protein to prothrombin
in the rat.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68, No. 7, 1653-1657 (1971)

157. SLÄTIS, P.;
The synthesis of prothrombin and proconvertin
in the reticulo-endothelial system.
Scand.J.Clin.Laborat.Invest.suppl. 10, 33 (1958)
158. SOLVONUK, P.F., L.B. JAQUES, J.E. LEDDY, L.W. TREVOY,
J.W.T. SPINKS;
Experiments with C^{14} - Menadione (vitamin K_3).
Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 79, 597-604 (1952)
159. SPINKS, J.W.T., L.B. JAQUES;
Tracer experiments in mammals with dicoumarol
labelled with carbon 14 .
Nature 166, 184 (1950)
160. STENFLO, J.;
Dicumarol-induced prothrombin in bovine plasma.
Acta Chem.Scand. 24, 3762-3763 (1970)
161. STENFLO, J., P.O. GANROT;
Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin.
I. Identification and purification of a dicoumarol-
induced abnormal prothrombin from bovine plasma.
J.Biol.Chem. 247, 8160-8166 (1972)
162. STENFLO, J.;
Vitamin K and biosynthesis of prothrombin.
II. Structural comparison of normal and dicoumarol-
induced bovine prothrombin.
J.Biol.Chem. 247, 8167-8175 (1972)
163. SUTTIE, J.W.;
Control of prothrombin and factor VII
biosynthesis by vitamin K.
Arch.Biochem.Biophys. 118, 166-171 (1967)

164. SUTTIE, J.W.;
Control of clotting factor biosynthesis
by vitamin K.
Fed.Proc. 28, 1696-1701 (1969)
165. SUTTIE, J.W.;
The effect of cycloheximid administration
on vitamin K - stimulated prothrombin formation.
Arch.Biochem.Biophys. 141, 571-578 (1970)
166. SUTTIE, J.W.;
Vitamin K and prothrombin synthesis.
Nutrition. Reviews 31, 105-109 (1973 a)
167. SUTTIE, J.W.;
Science 179, 192 (1973 b)
zitiert nach(166).
168. SWEET, G.B., G.L. ROMOSER, G.F. COMBS;
Further observations on the effect of sulfaquin-
oxaline, p-aminophenylarsenic acid and oxytetra-
cycline on blood clotting time of chicks.
Poultry Sci. 33, 430-432 (1954)
169. TAGGART, W.V., J.T. MATSCHINER;
Metabolism of menadione-6,7-³H in the rat.
Biochemistry 8, 1141-1146 (1969)
170. TAYLOR, J.D., G.J. MILLAR, L.B. JAKES, J.W.T. SPINKS;
The distribution of administered vitamin K₁-C¹⁴
in rats.
Can.J.Biochem. 34, 1143-1152 (1956)

171. TIEWS, J., H. ZUCKER;
Organische Stoffe mit Sonderwirkungen als Futter-
mittel und Mischfutterkomponenten.
aus: Handbuch der Futtermittel
Herausgeb.: M. Becker, K. Nehring, Bd. I, S. 468 (1969)
Verlag Paul Parey, Hamburg u. Berlin
172. VELTKAMP, J.J., H. MUIS, A.D. MULLER, H.C. HEMKER,
E.A. LOELIGER;
Additional evidence for the existence of a
precursor molecule of the prothrombin complex
in oral anticoagulation.
Thromb.Diath.Haemorrh. 25, 312-315 (1971)
173. VINAZZER, H.;
Gerinnungsstörungen in der Praxis.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1972)
174. WARTELE, O.;
Les facteurs prothromboplastiques du sang
de poule et de quelques mammifères.
Med. Diss. Paris (1958)
175. WEBER, F., O. WISS;
Vitamin K Group.
VIII. Active compounds and Antagonists.
aus: The vitamins, S. 457-465
Herausgeb.: W.H. Sebrell, jr., R.S. Harris
Academic Press New York, London (1971)
176. WEINER, M.;
in Intern. Encyclopedia of Pharmacol. and Therapie.,
Sect.6, Clin Pharmacol. (L. Lasagna, ed.) Vol. 2,
S. 519, Pergamon Press London (1966)

177. WINTERSTEIN, A.;
Biochemie und Pharmakologie der Antikoagulantien.
Thromb.Diath.Haemorrh. 2, 428-441 (1958)
178. WISS, O., H. GLOOR;
Absorption, distribution, storage and metabolites
of vitamin K and related quinones.
aus: Vitamins and Hormones, Vol. 24, S. 575-586
Herausgeb.: R.S. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine
Academic Press New York and London (1966)
179. WISS, O., F. WEBER, R. RÖEGG, O. ISLER;
Ober die biologische Aktivität der Vitamine
K₁ und K₂ und ihrer Isoprenologen.
Zeitschrift Physiol.Chem. 314, 245-249 (1959)

LEBENS LAUF

Am 18. Oktober 1945 wurde ich, Ernst Michael Bomhard, als Sohn des Pfarrers Ernst Bomhard und seiner Ehefrau Emmi, geb. Reissinger, in Hersbruck (Mittelfranken) geboren.

Nach 5 Jahren Besuch der Volksschule in Hohenstadt trat ich 1956 in die Oberrealschule Hersbruck ein, die ich nach 9 Jahren 1965 mit dem Zeugnis der Reife abschloß.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich das tierärztliche Studium an der Universität München; im Frühjahr 1971 schloß ich es hier mit dem Staatsexamen ab. Im Mai 1971 wurde mir die Bestallung als Tierarzt erteilt.

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation wurden im Frühjahr 1971 an den Instituten für Tierphysiologie und Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München begonnen.

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich
Herrn Prof. DDr. Dr. h.c. mult. J. Brüggemann
sowie Herrn Prof. Dr. Dr. J. Tiews†
für die Überlassung des Themas und die Arbeits-
möglichkeiten in ihren Instituten herzlich danken.

Ebenso bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Gropp
und Herrn Dr. V. Schulz für ihre stets gern
gewährte Hilfe bei Planung und Durchführung der
Experimente sowie bei der Fertigstellung der vor-
liegenden Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Ferner darf ich Frau A. Wetzel für die Durchführung
der chemischen Analysen sowie Fräulein E. Stadler
für technische Assistenz aufrichtig danken.

